



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

## ÇOCUK RENAL TRANSPLANT HASTALARINDA DIŞKI MİKROBİYOTASININ DEĞERLENDİRİLMESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

Dr. Gizem YILMAZ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nur CANPOLAT

İSTANBUL - 2024



T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ÇOCUK RENAL TRANSPLANT HASTALARINDA DIŞKI  
MİKROBİYOTASININ DEĞERLENDİRİLMESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

Dr. Gizem YILMAZ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Nur CANPOLAT  
İSTANBUL - 2024

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında bana yol gösterip zamanını ayıran, uzmanlık eğitimim süresince bilgi birikimini, deneyimlerini paylaşan, hoşgörü ve sabrını esirgemeyen her zaman örnek aldığım değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Nur CANPOLAT'a,

Kliniğimizin her alanda örnek olması için çabalayan, bilgi ve tecrübesiyle bizleri mesleki ve akademik hayata hazırlamak için her zaman yanımızda olan, iyi bir çocuk hekimi olarak yetişmemizde en büyük payı olan Anabilim Dalı Başkanımız saygıdeğer hocam Prof. Dr. Haluk ÇOKUĞRAŞ'a,

Daima yanımızda olduğunu bildiğimiz, bilgi birikimini aktarmaktan hiç yorulmayan, hepimizi birer çocuğu gibi seven kıymetli hocam Prof. Dr. Fügen Çullu ÇOKUĞRAŞ'a,

Eğitimim boyunca bilime olan aşkı ile daima örnek aldığım, sonsuz desteği ve sevgisini hep hissettiğim, bilgi ve tecrübeleri ile iyi bir hekim olmanın inceliklerini öğrendiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR'a,

Hekimliğine her zaman hayran olduğum, dünyada uğruna emek verilecek tek şeyin çocuklar olduğuna inanmamı sağlayan, üzerimde emeği çok büyük saygıdeğer abim Doç. Dr. Fatih AYGÜN'e,

Hekimliği ve akademik duruşu ile her alanda örnek aldığım, desteğini hep gördüğüm ve göreceğimi bildiğim ablam Doç. Dr. Tanyel ZÜBARİOĞLU'na,

Tez çalışmamın başından sonuna kadar her zorlanışında kapısını sonuna kadar açıp desteğini hiç esirgemeyen değerli abim Dr. Öğr. Üyesi Seha SAYGILI'ya ve tüm destekleri için Doç. Dr. Ayşe AĞBAŞ ve Uzm. Dr. Esra KARABAĞ YILMAZ'a,

Cerrahpaşa Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki birbirinden değerli, her birinin hekimlik öğretilerinden faydalandığım ve farklı yönleri ile örnek aldığım, uzmanlık eğitimimde büyük katkıları bulunan tüm saygıdeğer hocalarıma,

Bu zorlu süreçte beraber çalıştığım, yoğun uykusuz nöbetler tuttuğum, birlikte üzüldüğüm, birlikte sevindiğim, ikinci ailem olarak gördüğüm başta Dr. Nur ÇEBİ, Dr. Berfin Ayla HASTÜRK, Dr. İremnaz KARAHAN, Uzm. Dr. Neslihan GÜCÜYENER, Uzm. Dr. İpek ÜLKERSOY, Uzm. Dr. Berrak ÖZTOSUN, Uzm. Dr. Yusuf GÜNAY olmak üzere tüm asistan hekim arkadaşlarıma,

Birlikte çalıştığımız, yardımlaştığımız kapılarını her çaldığımda bana hep yardım eli uzatan başta Canan abla, Sevim abla olmak üzere tüm hemşire, sağlık personeli ve tıbbi sekreter arkadaşlarıma,

İhtiyacım olan her konuda yanımda olduklarını bildiğim desteklerini her daim hissettiğim her sorunumda beni güler yüzleri ile karşılayan sevgili kürsü sekreterimiz Türkan abla, Bircan abla ve emektar Cemil abiye,

Hayatımın ve asistanlığımın her zor anında yanımda olan, desteklerini her an hissettiğim ailem olmuş can dostlarım Uzm. Dr. Serpil MERİÇ TOPRAK, Dr. Betül AKGÜNEY, Dt. İrem BULUT, Özge AKIN DOĞAN ve Kübra SARIOĞLU'na,

Her zorluğun altından birlikte kalktığımız, en büyük desteğim aileme, kilometrelerce uzağımda olsa da hep yanımda hissettiğim canım ablam İrem ORUÇ'a, öz abim gibi sevdiğim Seçkin ORUÇ'a ve en minik destekçim Ekin ORUÇ'a

Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimle

Dr. Gizem YILMAZ

İstanbul, 2024

# İÇİNDEKİLER

|                                                              |             |
|--------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>SİMGE VE KISALTMALAR.....</b>                             | <b>I</b>    |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>                                 | <b>II</b>   |
| <b>TABLolar DİZİNİ .....</b>                                 | <b>III</b>  |
| <b>ETİK KURUL ONAYI.....</b>                                 | <b>IV</b>   |
| <b>TEZ FİNANSAL DESTEK BİRİMİ .....</b>                      | <b>V</b>    |
| <b>ÖZET.....</b>                                             | <b>VI</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                        | <b>VIII</b> |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                        | <b>1</b>    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>                                | <b>3</b>    |
| 2.1. Kronik Böbrek Hastalığı .....                           | 3           |
| 2.1.1. Tanım ve Sınıflama.....                               | 3           |
| 2.1.2. Epidemiyoloji.....                                    | 4           |
| 2.1.3. Etiyoloji.....                                        | 4           |
| 2.1.4. Kronik Böbrek Hastalığı Progresyonu.....              | 5           |
| 2.1.5. Son Dönem Böbrek Hastalığında Tedavi Seçenekleri..... | 5           |
| 2.2. İntestinal Mikrobiyota .....                            | 6           |
| 2.2.1. Tanımlar .....                                        | 6           |
| 2.2.2. Mikrobiyotayı Oluşturan Faktörler .....               | 6           |
| 2.2.3. Mikrobiyotayı Etkileyen Faktörler.....                | 7           |
| 2.3. Böbrek ve Mikrobiyota .....                             | 7           |
| 2.3.1. Böbrek Nakli ve Mikrobiyota .....                     | 8           |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>                              | <b>9</b>    |
| 3.1. Çalışma grubu .....                                     | 9           |
| 3.1.1. Çalışmaya Alınma Ölçütleri.....                       | 10          |
| 3.1.2. Çalışmadan Dışlanma Ölçütleri .....                   | 10          |
| 3.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler .....                    | 10          |
| 3.2.1. Klinik Bilgiler .....                                 | 10          |
| 3.2.2. Laboratuvar Verileri.....                             | 11          |
| 3.2.3. Numunelerin Toplanması, Saklanması ve Transferi.....  | 11          |

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3. Çalışmada Kullanılan Gaita Analiz Yöntemi.....                                               | 11        |
| 3.3.1. Gaita örneklerinden DNA izolasyonu.....                                                    | 12        |
| 3.3.2. 16S rRNA Sekans Analizi.....                                                               | 12        |
| 3.4. Çalışmada Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....                                            | 12        |
| 3.4.1. Biyoinformatik Analizler .....                                                             | 13        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                           | <b>14</b> |
| 4.1. Çalışma Grubunun Demografik ve Klinik Özellikleri .....                                      | 14        |
| 4.2. Çalışma Grubunun Gaita Mikrobiyota Verileri .....                                            | 16        |
| 4.2.1. Alfa ve Beta Çeşitlilik.....                                                               | 16        |
| 4.2.2. Taksonomik Çeşitlilik .....                                                                | 18        |
| 4.2.2.1. Filum Düzeyi .....                                                                       | 18        |
| 4.2.2.2. Cins Düzeyi.....                                                                         | 19        |
| 4.2.2.3. LEFSe Analizi ile Taksonomik Karşılaştırma .....                                         | 19        |
| 4.2.2.4. LEFSe Analizi ile Hasta Grubu Klinik Özelliklerine Göre<br>Taksonomik Karşılaştırma..... | 21        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                                                                          | <b>24</b> |
| 5.1. Çalışmamızın Güçlü ve Kısıtlı Yanları .....                                                  | 26        |
| <b>6. SONUÇLAR .....</b>                                                                          | <b>27</b> |
| <b>7. KAYNAKÇA .....</b>                                                                          | <b>28</b> |

## SİMGE VE KISALTMALAR

|                 |                                                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------|
| <b>ASV</b>      | : Amplicon Sequence Variants                           |
| <b>BH</b>       | : Kronik böbrek hastalığı                              |
| <b>CAKUT</b>    | : Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract |
| <b>CHO</b>      | : Karbonhidratların Fermantasyon Ürünü                 |
| <b>CREDIT-C</b> | : Chronic Renal Disease in Turkey - Children           |
| <b>CRP</b>      | : C- Reaktif Protein                                   |
| <b>GFH</b>      | : Glomeruler Filtrasyon Hızı                           |
| <b>HD</b>       | : Hemodiyaliz                                          |
| <b>İYE</b>      | : İdrar Yolu Enfeksiyonu                               |
| <b>KDIGO</b>    | : Kidney Disease Improving Global Outcomes             |
| <b>LEFSe</b>    | : Linear Discriminant Analysis Effect Size             |
| <b>PD</b>       | : Periton Diyalizi                                     |
| <b>RRT</b>      | : Renal Replasman Tedavisi                             |
| <b>SCFAs</b>    | : Kısa Zincirli Yağ Asitleri                           |
| <b>SDBH</b>     | : Son Dönem Böbrek Hastalığı                           |
| <b>SDS</b>      | : Standart Deviasyon Skoru                             |
| <b>TMA</b>      | : Trimetilamin                                         |
| <b>TMAO</b>     | : Trimetilamin-N-Oksit                                 |
| <b>VKİ</b>      | : Vücut Kitle İndeksi                                  |
| <b>WHO</b>      | : World Health Organization                            |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|           |                                                                                                               |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.  | Çalışmaya Dahil Edilen Hasta ve Kontrol Grubunu Gösteren Akış Şeması.....                                     | 9  |
| Şekil 2.  | Hasta ve Kontrol Grubu Karşılaştırmalı Alfa Çeşitlilik Analizleri .....                                       | 16 |
| Şekil 3.  | Hasta ve Kontrol Grubu Karşılaştırmalı Beta Çeşitlilik Analizleri .....                                       | 17 |
| Şekil 4.  | Hasta ve Kontrol Grubu Filum Seviyesinde Karşılaştırma. ....                                                  | 18 |
| Şekil 5.  | Hasta ve Kontrol Grubu Cins Seviyesinde Karşılaştırılması.....                                                | 19 |
| Şekil 6.  | Hasta ve Kontrol Grubu Taksonomik Verilerin LEFSe Analizi ile Karşılaştırılması.....                          | 20 |
| Şekil 7.  | Uzamış İshal Öyküsü Olan ve Olmayan Hasta Grubunun Karşılaştırılması .....                                    | 21 |
| Şekil 8.  | İYE Öyküsü Olan ve Olmayan Hasta Grubunun Karşılaştırılması .....                                             | 22 |
| Şekil 9.  | GFH <60ml/dk/1,73m <sup>2</sup> olan ve GFH >60ml/dk/1,73m <sup>2</sup> Hasta Grubunun Karşılaştırılması..... | 22 |
| Şekil 10. | Rejeksiyon Öyküsü Olan Hasta Grubu.....                                                                       | 23 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Kronik Böbrek Hastalığında Evreleme.....                                                    | 3  |
| Tablo 2. Böbrek Nakilli Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri .....                            | 15 |
| Tablo 3. Çalışma Grubunun (Hasta-Kontrol) Demografik ve Klinik Özelliklerinin Karşılaştırılması..... | 15 |



## ÖZET

### ÇOCUK RENAL TRANSPLANT HASTALARINDA DIŞKI MİKROBİYOTASININ DEĞERLENDİRİLMESİ

**Amaç:** Transplantasyon renal replasman tedavileri içinde en çok tercih edilen tedavi seçeneğidir. Böbrek transplantasyonu, son dönem böbrek hastalarında yaşam kalitesini büyük ölçüde arttırmakla birlikte yineleyen bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, tekrarlayan ya da inatçı ishaller, ilaç düzeylerinde meydana gelen değişiklikler ve rejeksiyonlar gibi sık hastane başvurularına yol açan sorunları da beraberinde getirmektedir. Böbrek transplantasyonu ile konağın bağırsak mikrobiyotasındaki değişimin ortaya çıkan pek çok probleme doğrudan ya da dolaylı olarak neden olduğu öne sürülmektedir. Bu çalışmanın amacı, böbrek nakli yapılan çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasındaki bağırsak mikrobiyotası ve bakteri çeşitliliğindeki farklılıkları incelemek ve bu değişikliklerin klinik izlemde ortaya çıkan sorunlara nasıl ve ne oranda yansıdığını göstermekti.

**Yöntem:** Bu kesitsel, gözlemsel, vaka kontrollü ve tek merkezli çalışmaya, 7 ila 21 yaş arasındaki 30 böbrek nakilli çocuk (ortanca yaş 15,6 yıl, 15 kız) ve yaş ve cinsiyet oranı benzer 25 sağlıklı çocuk dahil edildi. Dışkı numunelerini toplama sırasında devam eden gastrointestinal enfeksiyonu olan, herhangi bir neden ile antibiyotik ya da probiyotik kullanan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Bağırsak mikrobiyotasını değerlendirmek için 16S rRNA gen dizileme tekniği kullanıldı. Sonuçlar *Illinois* yazılım dataanaliz programı ile değerlendirildi.

**Bulgular:** Hasta ve kontrol grubu arasında yaş, cinsiyet ve beden kitle indeksi açısından fark yoktu. Bakteri çeşitlilik ve sayıları alfa ve beta çeşitlilik açısından değerlendirildiğinde hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu. Buna karşılık daha ayrıntılı karşılaştırmalar yapıldığında; filum seviyesinde, Verrucomicrobiota'ların ve Proteobacteria'ların nakilli grupta anlamlı oranda yüksek bolluğu saptandı (LEfSe analizinde LDA eşik değeri>2, p <0.05). Cins seviyesinde

değerlendirme yapıldığında hasta grubunda Verrucomicrobiota, Firmicutes, Actinobacteria ve Proteobacteria filumuna ait bazı cinslerde anlamlı artma ve Eubacteriales ve Bacteroidetes filumuna ait bazı cinslerde ise anlamlı azalma saptandı (LEfSe analizinde LDA eşik değeri>2, hepsi için  $p < 0.05$ ). Saptanan disbiyozisin olası nedenleri açısından hasta grubu ayrıntılı incelendiğinde; sık idrar yolu enfeksiyonu geçirenlerde Bacilli, Enterococcaceae, Corynebacteriaceae, ishal öyküsü olanlarda Pasteurellaceae, Haemophilus ve GFH<60 ml/dk/1,73m<sup>2</sup> olanlarda ise Acidaminococcus ve Clostridium cinslerinde anlamlı artış saptandı. Rejeksiyon öyküsü olan 6 hastada ise Clostridium ve Acidaminococcus artışı dikkat çekti.

**Sonuç:** Çalışmamız, pediatrik böbrek nakli hastalarının bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikleri inceleyen ve bu değişikliğin klinik süreçlerle ilişkisini ortaya koymaya çalışan az sayıdaki çalışmadan biridir. Böbrek nakilli çocuklarda özellikle cins bazında bakteri oranlarında anlamlı değişiklikler görülmüştür. Bağırsak mikrobiotasındaki bu gibi değişikliklerin özellikle böbrek nakli sonrasında klinikte sıkça gözlenen pek çok sorunun nedeni ve/veya sonucu olabileceği ön görülmektedir. Bu mikrobiyotal değişikliklerin neden-sonuç ilişkisini ve uzun dönem prognoz üzerindeki etkilerini belirlemek için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Bağırsak, Böbrek Nakli, Çocuk, Disbiyozis, Mikrobiyom, Mikrobiyota, Nakil, Pediatrik, Renal Transplant.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF INTESTINAL MICROBIOTA IN CHILDREN WITH RENAL TRANSPLANTATION

**Background:** Transplantation is the most preferred treatment option among renal replacement therapies. Although kidney transplantation significantly improves the quality of life in patients with end stage kidney disease, it also brings along issues such as recurrent bacterial or viral infections, persistent diarrhea, fluctuations in medication levels, and rejections, leading to frequent hospital visits. Changes in the gut microbiota of individuals undergoing kidney transplantation have been proposed as a potential direct or indirect contributor to several complications that may occur in the host. The aim of this study was to examine the differences in gut microbiota and bacterial diversity between children with kidney transplants and healthy children. The focus was on demonstrating how these changes were reflected in clinical outcomes and to what extent they contribute to the challenges observed during medical monitoring.

**Methods:** This cross-sectional, observational, case-control, and single-center study included 30 pediatric kidney transplant recipients aged between 7 and 21 years (median age 15.6 years, 15 females) and 25 age- and gender-matched healthy children. Patients with ongoing gastrointestinal infections during stool sample collection or those using antibiotics or probiotics for any reason were excluded from the study. The assessment of the intestinal microbiota was conducted using the 16S rRNA gene sequencing technique. The results were analyzed using the Illinois software data analysis program.

**Results:** There were no significant differences in age, gender, and body mass index between the patient and control groups. When bacterial diversity and abundance were evaluated in terms of alpha and beta diversity, there were no significant differences between the patient and control groups. However, more detailed

comparisons revealed significant increases abundance in the the phyla Verrucomicrobiota and Proteobacteria in the transplant group (LDA threshold >2 in LEfSe analysis,  $p < 0.05$ ). At the genus level, compared to the control group, the patient group showed an increase in some genera belonging to the phyla Verrucomicrobiota, Firmicutes, Actinobacteria, and Proteobacteria, and a decrease in some genera belonging to the phyla Eubacteriales and Bacteroidetes (LDA threshold >2 in LEfSe analysis, all with  $p < 0.05$ ). Possible causes of the dysbiosis observed in the patient group included a significant increase in species such as Bacilli, Enterococcaceae, Corynebacteriaceae, Pasteurellaceae, Haemophilus, Acidaminococcus, and Clostridium in individuals with a history of frequent urinary tract infections, diarrhea, and GFR <60 mL/min/1.73m<sup>2</sup>. Notably, patients with a history of rejection showed an increase in Clostridium and Acidaminococcus.

**Conclusion:** Our study is one of the few in the literature to examine changes in the gut microbiota of pediatric kidney transplant recipients and to attempt to elucidate the relationship between these changes and clinical processes. Of particular note are the significant alterations observed in bacterial compositions, especially at the genus level, observed in children with kidney transplantations. It is anticipated that such changes in the gut microbiota may be causative and/or consequential factors for commonly observed clinical issues following kidney transplantation. Comprehensive studies are needed to further elucidate the cause-effect relationship of the microbiota changes and their impact on long-term prognosis.

**Keywords:** Child, Dysbiosis, Gut, Intestine, Kidney, Microbiome, Microbiota, Pediatric, Renal Transplant, Transplantation.

# 1. GİRİŞ

Kronik böbrek hastalığı (KBH), böbreğin tüm fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici olabilen bozulma hali olarak tanımlanır. Son aşaması olan son dönem böbrek hastalığı (SDBH), hayatı sürdürmek için renal replasman tedavisi (RRT) gerektiren ciddi bir durumdur. Transplantasyon, renal replasman tedavileri içinde önemli bir tedavi seçeneğidir. Sağ kalımı uzatıp, yaşam kalitesini iyileştirir (1), ancak transplantasyon sonrası pek çok problem de beraberinde gelmektedir.

Böbrek transplantasyonu ile konağın bağırsak mikrobiyotasındaki değişimin ortaya çıkan pek çok probleme doğrudan ya da dolaylı olarak sebep olduğu öne sürülmektedir. Mikrobiyota, insan vücudunun özellikle belirli bölgelerinde yerleşmiş ortak yaşam alanını paylaşan mikroorganizma topluluklarıdır. Bakterilerin yanı sıra archaea, ökaryotlar ve virüsleri de kapsar. Mikrobiyom ise kalıcı mikroorganizma topluluklarının gen ve gen ürünleri (RNA, proteinler, metabolitler) dahil olmak üzere tümünü ve mikroçevre ile ilişkisini kapsayan bütünü ifade eder. Mikrobiyotayı etkileyen temel özellikler bağırsak bariyer dayanıklılığı, bariyerin fonksiyonunun korunması ve mikroorganizma çeşitliliğidir. Bu çeşitliliği etkileyen başlıca nedenler; doğum şekli, anne sütü alımı, ek gıdaya geçiş zamanı, beslenme şekli, kentsel/kırsal yaşam alanı ve ilaç kullanımındır. 2013 ve 2017 yıllarında iki fazlı olarak yapılan İnsan Mikrobiyom Projesi kapsamında, mikrobiyotadaki mikroorganizma sayısının insan hücre sayısının yaklaşık 10 katından fazla olduğu, mikrobiyal genomun ise insan genomunun 300 katından fazla olduğu açıklanmış ve belirli hastalıklarla ilişkisi de takip eden çalışmalarla gösterilmiştir (2).

Vücudun farklı bölgelerinde spesifik bakteri yoğunlukları gözlenmektedir. İntestinal florada ise firmicutes, bacteroidetes, proteobacteria ve actinobacteria olmak üzere özellikle 4 bakteri ailesinin hakimiyeti söz konusudur. Pek çok farklı sebeple mikrobiyotanın etkilenip belirli bakteriyel grupların bolluklarında değişiklikler sonucu “disbiyozis” ortaya çıkar. Disbiyozis, konak fizyolojisini etkileyerek klinikte karşımıza kronik hastalıklar, otoimmün hastalıklar, nöropsikiyatrik hastalıklar, cilt

hastalıkları ve obezite şeklinde çıkabilmektedir. Disbiyozis durumunda intestinal epitelde meydana gelen inflamasyon ve intestinal kaynaklı açığa çıkan toksik maddeler hem arteriovenöz sistemi etkileyip hem de mezengioproliferatif bir süreç başlatarak böbrekleri etkilemektedir (3). İntestinal kaynaklı açığa çıkan başlıca toksik maddeler; karbonhidratların fermentasyon ürünü (CHO), kısa zincirli yağ asitleri (SCFAs), protein yıkım ürünleri (p-cresol, indole), kolin ve L-karnitin metabolitleri olan trimetilamin (TMA) ve trimetilamin-N-oksit (TMAO)'tır. Kısa zincirli yağ asitlerinin mikrobiyotaya olumlu etkileri varken protein fermentasyon ürünleri ve özellikle TMAO'nun kronik kalp hastalığı ve kronik böbrek hastalığı progresyonu ile ilişkisi gösterilmiştir (4). Bağırsak ve böbrekler çift yönlü bir etkileşim içindedir. Disbiyozis sonucu intestinal kaynaklı artan toksinler, mevcut inflamatuvar sürecin artması ve bakteriyal dengenin bozulması ile böbrek hasarına yol açar (5,6). Diğer yandan böbrek hasarı sonucu oluşan üremi, oksidatif stres, fosfor ve potasyum kısıtlı diyetler ve kullanılan antibiyoterapiler intestinal florayı olumsuz etkileyerek disbiyozise sebep olmaktadır (7,8). Böbrek nakli olan hastalarda ise bu etkilenim ilaç doz değişiklikleri, diyare, enfeksiyon ve rejeksiyon riskinde artış olarak karşımıza çıkmaktadır (9–11).

Böbrek nakilli çocuklarda bağırsak mikrobiyotasındaki değişimi ve bunun klinik yansımalarını değerlendiren çalışma sayısı kısıtlıdır. Sıklıkla erişkin çalışmalarından bilgi edinilmektedir. Bu çalışma ile en az 1 yıl öncesinde transplante olmuş 7-20 yaş arasındaki çocuklarda bağırsak mikrobiyotasındaki değişimi ve artan rejeksiyon, idrar yolu enfeksiyonu, diyare ve ilaç düzeyi değişkenlikleri ile ilişkisini ortaya koymak amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kronik Böbrek Hastalığı

#### 2.1.1. Tanım ve Sınıflama

Kronik böbrek hastalığı, böbreğin tüm fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici olabilen bozulma hali olarak tanımlanır. Son dönem böbrek hastalığına dek ilerleyen bu bozulma ile böbreğin endokrin, metabolik fonksiyonları ve sıvı-elektrolit dengesini ayarlamadaki rolü etkilenmiş olur. Böbrek fonksiyonlarındaki bu etkilenmenin derecesini göstermek amacıyla klinikte en sık kullanılan parametre glomerüler filtrasyon hızı (GFH)'dır ve fonksiyone böbrekte glomerüllerden birim zamanda süzülen plazma miktarını ifade eder. Solüt maddelerin klirensini yansıtan bu parametre doğrudan ölçülemediğinden sıklıkla serum kreatinin konsantrasyonu kullanılarak tahmini bir değer olarak hesaplanmaktadır (12). Kronik böbrek hastalığı, GFH'na göre KDIGO tarafından 5 evrede derecelendirilmiştir (**Tablo 1**) (13). Evre 5 KBH, SDBH olarak adlandırılır ve GFH  $<15$  ml/dk/1,73m<sup>2</sup> veya RRT'ne ihtiyaç duyulması olarak tanımlanır. Özellikle son döneme ulaşmış çocuklarda artmış morbidite ve mortalitenin yanında büyümenin, psikososyal uyumun da etkilenmesi sebebiyle yaşam kalitesi önemli ölçüde bozulmuştur. Renal transplantasyon, renal replasman tedavi seçeneklerinden biridir. Sağ kalımı uzatır ve yaşam kalitesini iyileştirir (1).

**Tablo 1. Kronik Böbrek Hastalığında Evreleme (13)**

| Evre Kategorisi | GFH (ml/dk/1,73m <sup>2</sup> ) | İsimlendirme               |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------|
| Evre 1          | >90                             | Normal ya da yüksek        |
| Evre 2          | 60-89                           | Hafif azalmış              |
| Evre 3a         | 45-59                           | Hafif-orta azalmış         |
| Evre 3b         | 30-44                           | Orta-ağır azalmış          |
| Evre 4          | 15-29                           | Ağır azalmış               |
| Evre 5          | <15                             | Son dönem böbrek hastalığı |

GFH; glomerül filtrasyon hızı

### 2.1.2. Epidemiyoloji

Çocukluk döneminde KBH evrelerinin epidemiyolojik verileri oldukça kısıtlıdır. Bu durum, hastalığın erken dönemlerinde tanılanma oranlarındaki düşüklük ile ilişkilidir. Erişkinlere kıyasla daha az sıklıkta gözlense de araştırmalarda çocukluk çağındaki KBH prevalansı milyonda 15-74,7 aralığında izlenmektedir (14). Yapılabilen sınırlı sayıda çalışmada KBH insidansı ülkelere göre farklılıklar göstermektedir. KBH Evre 3-4 için Avrupa ülkelerinin verileri yaşa bağlı popülasyonda milyonda 11-12, KBH Evre 4-5 için milyonda 8 olarak bildirilmiştir. İspanya ve İtalya verilerine göre ise prevalansı milyonda 55-60 ila 70-75 arasında değişkenlik göstermektedir. Orta Doğu ve Güney Doğu Asya'da KBH insidansı yaşa bağlı popülasyonda milyonda ortalama 38 olarak bildirilmiştir. Latin Amerika ülkeleri için ise rakamlar 2,8-15,8 aralığındadır. Güney Afrika'daki insidans verileri milyonda 1-2 ile tahmin edilenin oldukça altında rakamlarla sunulmuştur (15-21). Türkiye verilerine göre KBH insidansı yaşa bağlı popülasyonda milyonda 10,9 olarak, bir başka çalışmada ise prevalans yüzde 3,47 olarak bildirilmiştir (22,23).

Son dönem böbrek hastalığı insidans ve prevalans verileri ise ülkelerin gelişmişlik düzeyleri ile ters orantılıdır. Gelişmekte olan pek çok ülkede sağlık hizmetine erişimdeki yetersizlikler bu rakamlara doğrudan yansımaktadır. Bu sebeple RRT altındaki çocuk hastaların ortalama %80'i Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'dandır. Çocukluk çağında RRT insidansı 11 Avrupa ülkesi arasında ve Avustralya'da yaşa bağlı popülasyonda milyonda 9,5 iken Amerika Birleşik Devletleri'nde 15,5 olarak raporlanmıştır. Tüm bu verilerle 2008'de, 20 yaşından küçük çocuklarda ortalama RRT insidansı yaşa bağlı popülasyonda milyonda 9 olarak bildirilmiştir (17).

### 2.1.3. Etiyoloji

Kronik böbrek hastalığının etiyolojisi çocuklarda erişkinlerden çok farklıdır. Erişkinlerde ana sebepler diyabet ya da hipertansiyon iken çocuklarda ilk sırada konjenital anomaliler gelir (12). Çocuklarda en sık sebepler böbrek ve idrar yollarının konjenital anomalileri (CAKUT), konjenital nefropatiler ve glomerülonefritlerdir. Altı yaşından küçük çocuklarda en sık neden CAKUT iken, altı yaşından büyük çocuklarda

glomerülonefritler önde gelen nedenlerdir (17). Bunun yanında etiyolojiyi genetik, çevresel ve kültürel faktörler de etkiler (14).

#### **2.1.4. Kronik Böbrek Hastalığı Progresyonu**

Ciddi orandaki nefron kaybının ardından, böbrek hasarını başlatan asıl olaydan bağımsız ikincil nedenlerin de katkısıyla SDBH gelişir. Böbrekteki bu hasar, glomerüler skleroz, interstisyel fibrozis, peritübüler kapiller kaybı ve tübüler atrofi ile sonuçlanır (24). Progresyona katkıda bulunan çeşitli risk faktörleri arasında genetik yapı, yaş, puberte, düşük doğum ağırlığı gibi değiştirilemez risk faktörlerinin yanında hipertansiyon, proteinüri, dislipidemi, anemi, elektrolit bozuklukları ve obezite gibi değiştirilebilen risk faktörleri yer alır (25–28). Kan basıncının yakın kontrolü, proteinürinin azaltılması ve obezitenin önlenmesinin KBH olan çocuklardaki böbrek hasarının ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir (29).

#### **2.1.5. Son Dönem Böbrek Hastalığında Tedavi Seçenekleri**

Kronik böbrek hastalığının erken dönemde tanılandırılıp tedavi başlanması, hastalığın ilerlemesini yavaşlatsa da KBH olan birçok çocukta, çocukluk çağında SDBH gelişebilir. Glomerüler filtrasyon hızı 15 ml/dk/1,73 m<sup>2</sup>'nin altına düştüğünde ve/veya anüri, tedaviye dirençli hipertansiyon, elektrolit anormallikleri, üremik semptomlar, nörolojik bulgular geliştiğinde renal replasman tedavilerine başlanır (30). Renal replasman tedavileri, periton diyalizi (PD), hemodiyaliz (HD) ve böbrek nakli olmak üzere üç farklı şekilde yapılabilir. Bu tedavi yöntemlerinden hangisinin tercih edileceği, hastanın yaşı, sosyokültürel düzeyi, tedavi merkezinin deneyimi ve ülkelerin sağlık hizmetlerine ulaşım olanaklarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (31,32).

Böbrek nakli günümüzde SDBH'da en seçkin tedavi yöntemidir. Böbrek nakli HD ve PD'ye göre yaşam süresini uzatması, hastaneye yatış oranlarını azaltması ve yaşam kalitesini artırması yönleri ile avantajlıdır. Nakil tercih edilen ve hatta hedeflenen bir yöntemdir (33). Ancak bunun yanısıra nakil sonrası pek çok problem de beraberinde gelmektedir. Nakil sonrası uzun dönem bağışıklık baskılayıcı ajanlar kullanılması ile artan enfeksiyonlar ve dolayısıyla yine uzun dönem kullanılan antibiyotikler ile bağırsak florasında bozulmalar meydana gelir (1,34). Böbrek nakilli

hastaların beşte birinde kronik diyarelerin, abdominal şikayetlerin varlığı nakil sonrasında yaşam kalitesindeki düşüşle ilişkilendirilir (1).

## **2.2. İntestinal Mikrobiyota**

### **2.2.1. Tanımlar**

Mikrobiyota, insan vücudunun özellikle belirli bölgelerinde yerleşmiş ortak yaşam alanını paylaşan mikroorganizma topluluklarıdır. Bakterilerin yanı sıra archaea, ökaryotlar ve virüsleri de kapsar. 2013 ve 2017 yıllarında iki fazlı olarak yapılan İnsan Mikrobiyom Projesi kapsamında, mikrobiyotadaki mikroorganizma sayısının insan hücre sayısının yaklaşık 10 katından fazla olduğu, mikrobiyal genomun ise insan genomunun 300 katından fazla olduğu açıklanmıştır (2).

Mikrobiyom ise bu kalıcı mikroorganizma topluluklarının gen ve gen ürünleri (RNA, proteinler, metabolitler) dahil olmak üzere tümünü ve mikroçevre ile ilişkisini kapsayan bütünü ifade eder (35,36). İnsan mikrobiyomu yaşamın ilk yıllarından itibaren çeşitli faktörlerle değişip farklılaşıyor olsa da pek çok patolojik süreç ve hastalıkla ilişkisi çalışmalarla gösterilmiştir (2,37). Sağlıklı bir mikrobiyota “öbiyozis” olarak adlandırılır. Ancak farklı sebeplerle mikrobiyotanın etkilenip belirli bakteriyel grupların bolluklarında meydana gelen değişiklikler sonucu ortaya çıkan bozulmuş mikrobiyota ise “disbiyozis” olarak adlandırılır (38,39).

İntestinal mikrobiyotaya ait mikroorganizmalar, insan vücudunda kolonize halde varlıklarını sürdürmektedir. Bu ikili yaşam tarzı, simbiyotik bir ilişkiyi gösterir (40). Bir yandan mikroorganizmalar, yaşamsal destek sağlarken diğer yandan insan vücudunda gen ekspresyonu, mukozal bariyer oluşturma, sindirim, emilim, detoksifikasyon, enflamatuvar ve immün süreçlerde aktif rol oynamaktadır (41).

### **2.2.2. Mikrobiyotayı Oluşturan Faktörler**

İntestinal mikrobiyota, insanlarda doğum anından itibaren şekillenmeye başlar. Vajinal doğumla dünyaya gelen bebeklerde, anne genitoüriner sistemindeki mikroorganizmalarla etkileşimde bulunduğundan sezaryenle doğan bebeklere kıyasla

bağışıklık sistemi daha güçlü kabul edilmektedir (42–44). Beslenme şeklinin mikrobiyota üzerine etkileri yapılan çalışmalarda gösterildi. Anne sütü kullanımın formüle mama ile beslenen yenidoğanlara göre yaşamın ilerleyen dönemlerinde alerjik hastalıklar, sık enfeksiyonlar ve/veya emilim problemleri açısından koruyucu olduğu gösterildi (45). Bu faktörlerin yanısıra mikrobiyotayı ek gıdaya geçiş zamanı, beslenme içeriği, kentsel / kırsal yaşam alanı ve ilaç kullanımının da etkilediği bilinmektedir (43,46).

İntestinal mikrobiyota tüm bu etkenlerde birlikte farklılaşarak erişkin döneme ulaşıldığında Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria ve Actinobacteria olmak üzere özellikle dört majör bakteri ailesinin hakimiyeti söz konusu olur (47). Erişkin dönemde kronik hastalıklar, kullanılan ilaçlar ya da yapılan diyetler ile bu farklılaşma devam etmekte ve ileri yaşlarda sık rastlanan gastrointestinal sorunlarla ilişkilendirilmektedir (48).

### **2.2.3. Mikrobiyotayı Etkileyen Faktörler**

Mikrobiyota parmak izi gibi, her bireyde kişiselleştirilmiş ve bireyler arasında farklılıklar gösteren eşsiz bir yapıya sahiptir. Bu yapı, yaşamın ilk yıllarında şekillendikten sonra kişisel, sosyokültürel, beslenme ve genetik özelliklere bağlı olarak farklılıklar gösterir. Bireyin diyet şekli, yaşadığı çevre, birlikte yaşadığı birey sayısı, bulunduğu toplumun beslenme özellikleri ve sosyoekonomik durumu gibi değişken birçok faktör büyük ölçüde etkileyebilir. Bunların yanı sıra kişinin kronik hastalıkları, ilaç kullanım geçmişi (ilaç türü, sıklığı, süresi vb.) gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak da değişiklik gösterebilir (46).

### **2.3. Böbrek ve Mikrobiyota**

Bağırsak ve böbrekler çift yönlü bir etkileşim içindedir. Disbiyozis, artan intestinal kaynaklı toksinler, mevcut enflamatuar sürecin artması ve bakteriyel dengenin bozulması ile böbrek hasarına yol açar (5,6). Diğer yandan böbrek hasarı sonucu oluşan üremi, oksidatif stres, fosfor ve potasyum kısıtlı diyetler ve kullanılan antibiyoterapiler intestinal florayı olumsuz etkileyerek disbiyozise sebep olmaktadır (7,8). Disbiyozis durumunda intestinal epitelde meydana gelen enflamasyon ve

intestinal kaynaklı açığa çıkan toksik maddeler hem arteriovenöz sistemi etkileyip hem de mezengioproliferatif bir süreç başlatarak böbrekleri etkilemektedir (3). İntestinal kaynaklı açığa çıkan başlıca toksik maddeler; karbonhidratların fermantasyon ürünü (CHO), kısa zincirli yağ asitleri (SCFAs), protein yıkım ürünleri (p-cresol, indole), kolin ve L-karnitin metabolitleri olan trimetilamin (TMA) ve trimetilamin-N-oksit (TMAO)'tir. Kısa zincirli yağ asitlerinin mikrobiyotaya olumlu etkileri varken protein fermantasyon ürünleri ve özellikle TMAO'nun KBH progresyonu ile ilişkisi gösterilmiştir (4).

Çalışmaların çoğu erişkin kaynaklı olsa da az sayıda çocuk hastada yapılan çalışmalar KBH'da bağırsak mikrobiyotasının değiştiğini ve bağırsak geçirgenliğinin arttığını göstermiştir (49). Disbiyozisin inflamatuvar süreçler ve immün sistem üzerine etkileri gösterilmiştir (50). İntestinal mikrobiyotadaki bu farklılaşmanın HD, PD ve böbrek nakli olmuş hastalardaki etkisi araştırılmış; yaşam kalitesinde azalma, çeşitli enfeksiyonlarda artma, immünsüpresif ajan dozlarında ani dalgalanmalarla ilişkisi ortaya konmuştur (1,11,51).

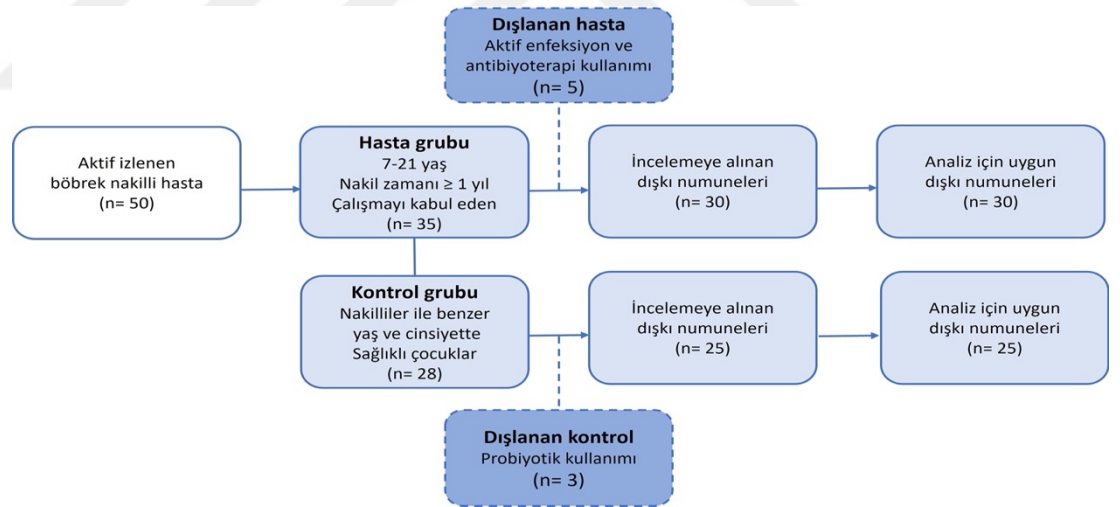
### **2.3.1. Böbrek Nakli ve Mikrobiyota**

Son dönem böbrek hastalığı tedavi modalitelerinden olan böbrek nakli yeniden işlev kazanan böbrek fonksiyonları açısından her ne kadar yüz güldürücü sonuçları olsa da solid organ transplantasyonu birçok sorunu beraberinde getirmektedir. Nakil sonrasında uzun süreli kullanılan immünsüpresif ajanlar, koruyucu ya da tedavi edici olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklerin intestinal mikrobiyotada değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (51,52). Bu değişikliğin nakil sonrası karşılaşılan kronik diyareler, idrar yolu enfeksiyonları, rejeksiyonlar ve ilaç doz değişiklikleri ile olan ilişkisi de incelenmiştir (9–11,50). Ancak bu kanıtlar daha çok erişkin çalışmalarına dayanmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma grubu

Bu çalışma için, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji polikliniğinden izlenen ve SDBH tanısı ile böbrek nakli yapılmış olan 7-21 yaş arası 35 hasta değerlendirmeye alındı. Bunlardan 5'i dışkı örneklerinin toplandığı sırada aktif enfeksiyonu ve antibiyotik tedavisi kullanımı olması nedeni ile çalışmaya dahil edilmedi. Kontrol grubu olarak benzer yaş ve cinsiyette, böbrek fonksiyon testleri normal ve çalışmaya katılmayı kabul eden 28 sağlıklı çocuk alındı. Ancak 3'ü dışkı örneklerinin toplandığı sırada probiyotik kullanım öyküsü olduğundan çalışmaya dahil edilmedi (Şekil 1).



Şekil 1. Çalışmaya Dahil Edilen Hasta ve Kontrol Grubunu Gösteren Akış Şeması

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı (28.07.2022 tarih ve 441792 sayılı belge) sonrasında başlandı. Çalışmaya katılan gönüllüler ve aileleri ayrıntılı bilgilendirildi. Tüm hasta ve sağlıklı kontrollerden ve tümünün bakım veren sorumlu ebeveyninden aydınlatılmış onam alındı. Çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi tarafından (Proje ID: 36777) desteklendi.

### **3.1.1. Çalışmaya Alınma Ölçütleri**

- Çalışma sırasında 7-21 yaş arasında olmak
- En az 1 yıldır böbrek nakli ve fonksiyone greft ile izleniyor olmak

### **3.1.2. Çalışmadan Dışlanma Ölçütleri**

- Transplantasyon öncesi SDBH dışında kronik hastalığı bulunması
- Malignite ve kemoterapi öyküsünün bulunması
- Dışkı örnek alımı sırasında aktif enfeksiyon saptanması
- Dışkı örneklerinin toplandığı sırada antibiyotik kullanım öyküsü
- Dışkı örneklerinin toplandığı sırada probiyotik kullanım öyküsü
- Hasta ve yakını tarafından çalışmaya katılımın kabul edilmemesi
- Çalışmada yapılacak tetkiklerin tamamlanamaması

## **3.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler**

Çalışmaya dahil edilen hastaların hepsi aşağıda ayrıntılı açıklanan klinik ve laboratuvar verileri ile değerlendirildi.

### **3.2.1. Klinik Bilgiler**

Hastaların doğum tarihi, cinsiyeti, doğum şekli, beslenme düzeni, primer böbrek hastalığı, primer hastalığın tanı yaşı, KBH tanı zamanı, RRT başlangıç tarihi, böbrek nakli zamanı, kullanmakta olduğu ilaçlar ve bunlara ait diğer klinik veriler dosyalarından kaydedildi. Böbrek nakli yapılan hastaların nakil sırasındaki antropometrik ölçümler ve vücut kitle indeksi (VKİ), HLA (Human Lökosit Antijeni) doku uyumu, donör tipi, indüksiyon ve immünsüpresif tedavileri, nakil sonrası rejeksiyon öyküsü ve tarihi, rejeksiyon tipi, rejeksiyon sürecinde verilen tedaviler, nakil sonrası geçirilen idrar yolu enfeksiyonu ve uzamış ishal öyküleri, hasta dosyalarından kaydedildi. Sağlıklı kontrol grubuna dahil edilen çocukların ise cinsiyeti, yaşı, boy, kilo ve VKİ, doğum şekli, beslenme özellikleri kaydedildi.

Antropometrik ölçümler ve VKİ'nin standart deviasyon değerleri (SDS), Neyzi ve ark. (53) tarafından oluşturulan ulusal referans verilerine göre hesaplandı.  $VKI \geq 2$  SDS olan hastalar obez olarak tanımlandı. Allograft rejeksiyon, transplant sonrası akut ya da kronik herhangi bir dönemde grefte yönelik immunolojik zararlanma ile birlikte allograft fonksiyonlarının bozulması olarak tanımlandı (54). İdrar yolu enfeksiyonu (İYE), kusma, ateş, dizüri gibi semptomların eşlik ettiği, piyüri ve idrar kültüründe anlamlı bakteri üretilmesi olarak tanımlandı (55). Bağırsağın sindirim, emilim ve emilim sonrası süreçlerdeki bozuklukları ile dışkılamanın sıklığında artış ve dışkı kıvamındaki azalma ishal olarak tanımlandı (56).

### **3.2.2. Laboratuvar Verileri**

Hastalar, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji polikliniğinde takipte olduğundan üç ayda bir yapılan rutin poliklinik kontrolleri sırasında çalışmaya dahil edildi. Rutin laboratuvar sonuçları [üre, kreatinin, ilaç düzeyleri ve CRP (C-Reaktif Protein)] hastaların son vizitlerine ait kayıtlardan elde edildi. Tahmini GFH, serum kreatinin düzeyi kullanılarak modifiye Schwartz formülü ile hesaplandı.

### **3.2.3. Numunelerin Toplanması, Saklanması ve Transferi**

Çalışma sırasında hasta ve sağlıklı kontrol grubundan yaklaşık 25 mg dışkı örneği kaşıkla steril kaplara alındı. Bu örneklerden dışkı orta bölümü steril kaba ayrılarak daha sonra çalışılmak üzere  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Numuneler 16S rRNA dizileme metodu ile mikrobiyota analizi yapılmak üzere soğutma sistemleri ile Teknogen Biyomühendislik ve Teknolojik Sistemler A.Ş yetkililerine teslim edildi.

### **3.3. Çalışmada Kullanılan Gaita Analiz Yöntemi**

Dışkı numunelerinin her biri için kullanılan kitler ile 16S rRNA dizileme metodu kullanılarak bakteriyal 16S geni küçük ribozomal alt ünitenin sekonder yapısında yer alan 9 hiperdeğişken (V1-V9) bölge üzerinden taksonomik sınıflama bilgileri edinildi.

### 3.3.1. Gaita örneklerinden DNA izolasyonu

Dışkı numuneleri DiaRex® Stool Genomic DNA Extraction Kit (Kat No: SD-0323, Ankara) kullanılarak yapıldı. Kısaca 25-50 mg dışkı numunesi üzerine 250µl Stool Lysis (SLD) solüsyonu eklendi. Ardından üzerine 15mg cam ve 10 adet zirkon boncuk eklenerek homojenizatör cihazında 4000 rpm 2 x 20 saniye uygulama yapıldı. Homojenizasyondan sonra üzerine 25µl Proteinaz K (PKD) solüsyonu eklendi ve 56 °C'de 60 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda tüm içerik 5000 g'de 5 dakika santrifüj yapılarak süpernatant yeni tüpe aktarıldı. Süpernatant üzerine 200µl Lysis (LBD) solüsyonu eklendi ve 70 °C'de 10 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından lizata 250 µl mutlak etanol eklendi ve tüm içerik kolona aktarıldı. Kolon 8000 g x 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra yeni tüpe aktarıldı. Ardından kit protokolüne göre yıkamalar yapıldıktan sonra 100µl Elüsyon (EBD) solüsyonu eklendi ve 2 dakika inkübasyondan sonra 8000 g x 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edildi.

### 3.3.2. 16S rRNA Sekans Analizi

16S V3-V4 (Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplles J, Quast C, vd. (2013)) bölgeleri, Illumina tarafından yayınlanan protokol kullanılarak amplifiye edildi (16S Metagenomik Dizi Kütüphanesi Hazırlama, Illumina, Parça # 15044223 Rev. B). Amplifiye edilmiş ve indekslenmiş kütüphaneler, üretici talimatlarına uyularak AmpureXP (Beckman Coulter, ABD) boncukları ile saflaştırıldı. Saflaştırmadan sonra kütüphane miktarı Qubit 3.0 (Therm Fisher, ABD) ile ölçüldü ve kütüphanenin molaritesi yine aynı protokolde Illumina tarafından sağlanan algoritma kullanılarak hesaplandı. Protokolü takip ederek örnekler, 4nM'ye normalize edildi ve havuzlandı. Havuzlanan kütüphane, üretici talimatlarına uyularak Illumina reaktan kiti ile birleştirildi.

### 3.4. Çalışmada Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmada, kategorik değişkenlere ait tanımlayıcı veriler, sayı ve yüzde olarak (n, %); sürekli değişkenler ise ortalama ( $\pm$ SD) veya ortanca (min-max) şeklinde ifade edildi. Sürekli verilerin analizine geçmeden önce, normal dağılıma uyup

uymadığını belirlemek amacıyla Shapiro-Wilk testi uygulandı. Normal dağılım göstermeyen veriler için ikili grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi, üç veya daha fazla grup karşılaştırmalarında ise Kruskal-Wallis testi kullanıldı.

Sürekli değişkenlerin birlikte nasıl bir seyir gösterdiğini değerlendirmek için korelasyon analizi gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılım göstermediği durumlarda Spearman korelasyon analizi tercih edildi. Tüm istatistiksel analizlerde, %5 tip 1 hata ve %95 güven aralığı çerçevesinde istatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi. Çalışma verileri, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yazılım programı kullanılarak değerlendirildi.

### **3.4.1. Biyoinformatik Analizler**

Çift yönlü (2x250) Illimuna okumaları qiime2 sistemine yüklendi (57). İlk olarak bütün numunelerin birbirine yakın 100X derinlik üzerinde olduğu tespit edildi ve bu aşamada hiçbir numune çalışma dışı bırakılmadı. Kalite temizlemesi, kimera deteksiyonu qiime2 üzerinde DADA2 algoritması (via q2-dada2) kullanılarak gerçekleştirildi (58). Kalite skoru çoğunlukla 30'un altında olan kısımlar dışarıda bırakılarak ASV'ler (Amplicon Sequence Variants) oluşturuldu. Elde edilen ASV'ler Silva 138 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>) veritabanı ile haritalanarak taksonomik tablolar oluşturuldu (59,60). Veri görselleştirme ve biyoistatistiksel analizler için qiime2 ile oluşturulan dosyalar R 4.1 programlama dili R studio kullanılarak işleme alındı (61). Bir örnekteki ilgili taksonomik birimlerin çeşitliliğini değerlendirmek için kullanılan alfa çeşitlilik değerlendirmesi, Chao1, Shannon ve Simpson dahil olmak üzere üç farklı indeks kullanılarak yorumlandı. Gruplar arasındaki p değerleri Kruskal-Wallis testi ile hesaplandı (62). Bireyler arasındaki taksonomik farklılıkları değerlendirmek için kullanılan beta çeşitlilik analizleri, Jaccard, Bray-Curtis, ağırlıklı ve ağırlıksız Unifrac temel alınarak hesaplandı (63). Taksonomik olarak gruplar arasında diferansiyel bolluk analizleri DeSeq2 paketi kullanılarak tespit edildi (64). LEFSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) analizi ile gruplar arasındaki en temel farklılıklar LDA skoru  $\log_2$ 'den fazla olacak ve  $p < 0,05$  istatistiksel anlamlı şekilde tespit edildi (63,65,66).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma Grubunun Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen 30 böbrek nakilli çocuk hastanın ortalama yaşı 16 (7,4 - 20,8) yıl, kız erkek oranı 15/15 idi. Hastaların ortalama RRT başlangıç yaşı 5,6 (0,1 - 15,2) yıl idi. Pretransplant RRT olarak; 12 hastada (%40) hemodiyaliz, 17 hastada (%57) periton diyalizi ve 1 hasta (%3) diyaliz programına alınmadan (preemptif) böbrek nakli yapılmıştı.

Ortalama nakil yaşı 9,4 (2,6 - 17,4) yıl idi. Onüç hasta canlı donörden 17'si ise kadavradan böbrek nakli olmuştu. Nakil sonrası geçen ortalama süre 6,7 (1,1 - 14,4) yıl idi. Onbir hastanın (%36,6) nakil sonrası geçen süresi 1 ila 5 yıl, 14 hastanın (%46,6) 5 ila 10 yıl ve 5 hastanın (%16,6) 10 yılın üzerinde idi. Toplam 6 hastada rejeksiyon öyküsü mevcuttu. İki hastada 2 rejeksiyon atağı, diğer 4 hastada ise 1 atak görülmüştü. Bunların hepsi T hücre aracılı rejeksiyondur. Ve hiçbirisi çalışmadan önceki 6 ay içerisinde değildi. Hastaların ortalama GFH 68,3 ml/dk/1,73 m<sup>2</sup> idi. Oniki hastanın (%40) GFH 60 ml/dk/1,73 m<sup>2</sup> altında idi. Böbrek nakilli hastaların demografik ve klinik özellikleri **Tablo 2**'de gösterilmiştir.

Hasta ve sağlıklı kontroller arasında yaş, cinsiyet, VKİ ve VKİ-SDS'leri açısından anlamlı fark yoktu (**Tablo 3**).

**Tablo 2. Böbrek Nakilli Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri\***

| Böbrek nakilli hasta, n                   | 30                |
|-------------------------------------------|-------------------|
| Yaş, yıl                                  | 16 (7,4 - 20,8)   |
| Kız / Erkek, n (%)                        | 15 (50) / 15 (50) |
| VKİ, kg/m <sup>2</sup>                    | 20,7 (13,6 - 39)  |
| VKİ-SDS                                   | -0,1 (-2,5 - 4,0) |
| RRT başlangıç yaşı, yıl                   | 5,6 (0,1 - 15,2)  |
| Pre-transplant RRT süresi, yıl            | 2,05 (0 - 8,6)    |
| Pre-transplant RRT tipi, n (%)            |                   |
| Hemodiyaliz                               | 12 (40)           |
| Periton diyalizi                          | 17 (57)           |
| Pre-emptif transplant                     | 1(3)              |
| Nakil yaşı, yıl                           | 9,4 (2,6 - 17,4)  |
| Nakil sonrası geçen süre, yıl             | 6,7 (1,1 - 14,4)  |
| Canlı / kadavra donör, n (%)              | 13 (76) / 17 (24) |
| Rejeksiyon öyküsü, n (%)                  | 6 (20)            |
| İshal öyküsü, n (%)                       | 14 (46)           |
| İdrar yolu enfeksiyonu öyküsü, n (%)      | 16 (53)           |
| GFH <60 ml/dk/1,73 m <sup>2</sup> , n (%) | 12 (40)           |

\*Sürekli değişkenler ortalanca (aralık) olarak verilmiştir.

VKİ; beden kitle indeksi, VKİ-SDS; beden kitle indeksi standart deviasyon skoru, RRT renal replasman tedavisi, GFH; glomerül filtrasyon hızı

**Tablo 3. Çalışma Grubunun (Hasta-Kontrol) Demografik ve Klinik Özelliklerinin Karşılaştırılması\***

|                             | Böbrek Nakli<br>(n= 30) | Kontrol<br>(n= 25) | P    |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------|------|
| Çalışma sırasında yaş, yıl  | 16 (7,4 - 20,8)         | 15,6 (7,6 - 17,7)  | 0,17 |
| Kız/Erkek, n (%)            | 15 (50) / 15 (50)       | 10 (40) / 15 (60)  | 0,16 |
| VKİ, kg/m <sup>2</sup>      | 20,7 (13,6 -39,0)       | 24,4 (16,2 – 29,6) | 0,14 |
| VKİ-SDS                     | -0,1 (-2,5 – 4,0)       | 1,0 (-0,7 – 1,83)  | 0,07 |
| Obezite (VKİ-SDS ≥2), n (%) | 2 (6,6)                 | 0 (0)              | 0,29 |

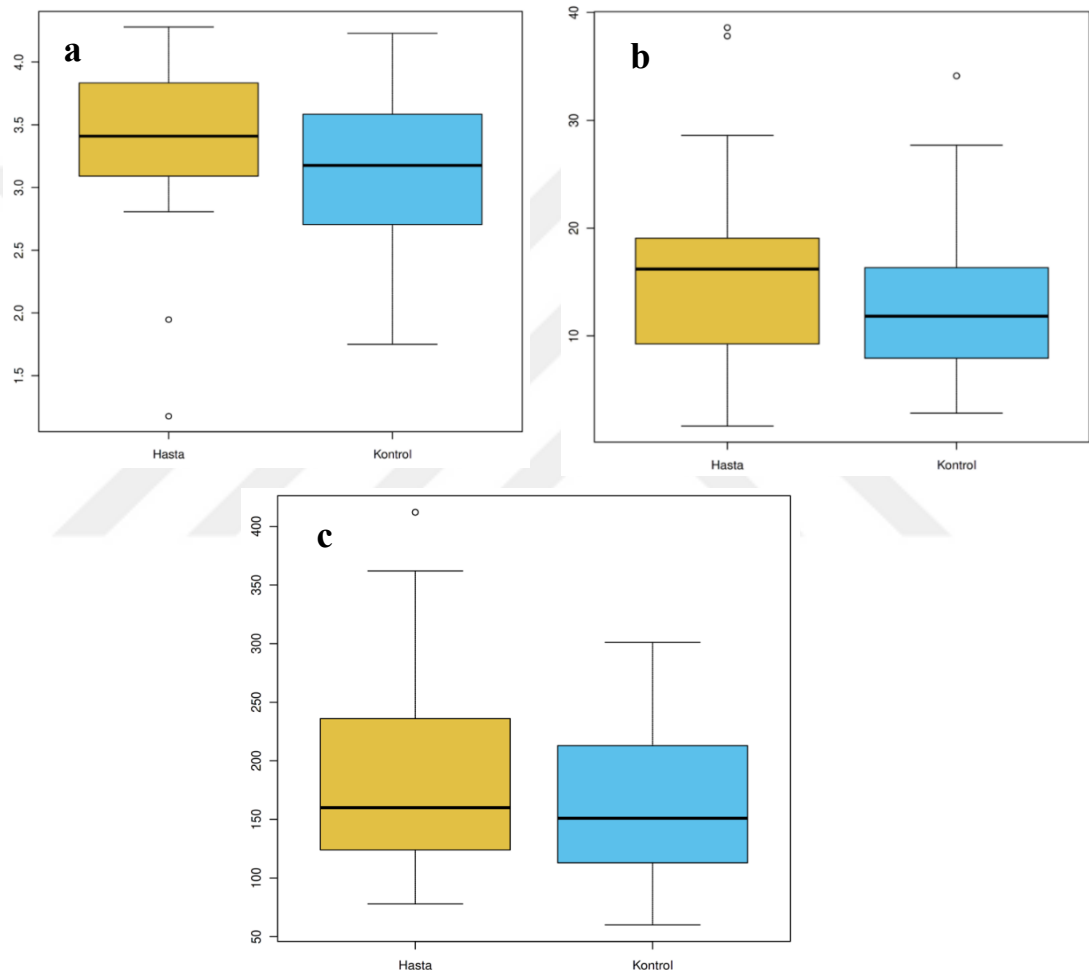
\*Sürekli değişkenler ortalanca (aralık) olarak verilmiştir.

VKİ; beden kitle indeksi, VKİ-SDS; beden kitle indeksi standart deviasyon skoru

## 4.2. Çalışma Grubunun Gaita Mikrobiyota Verileri

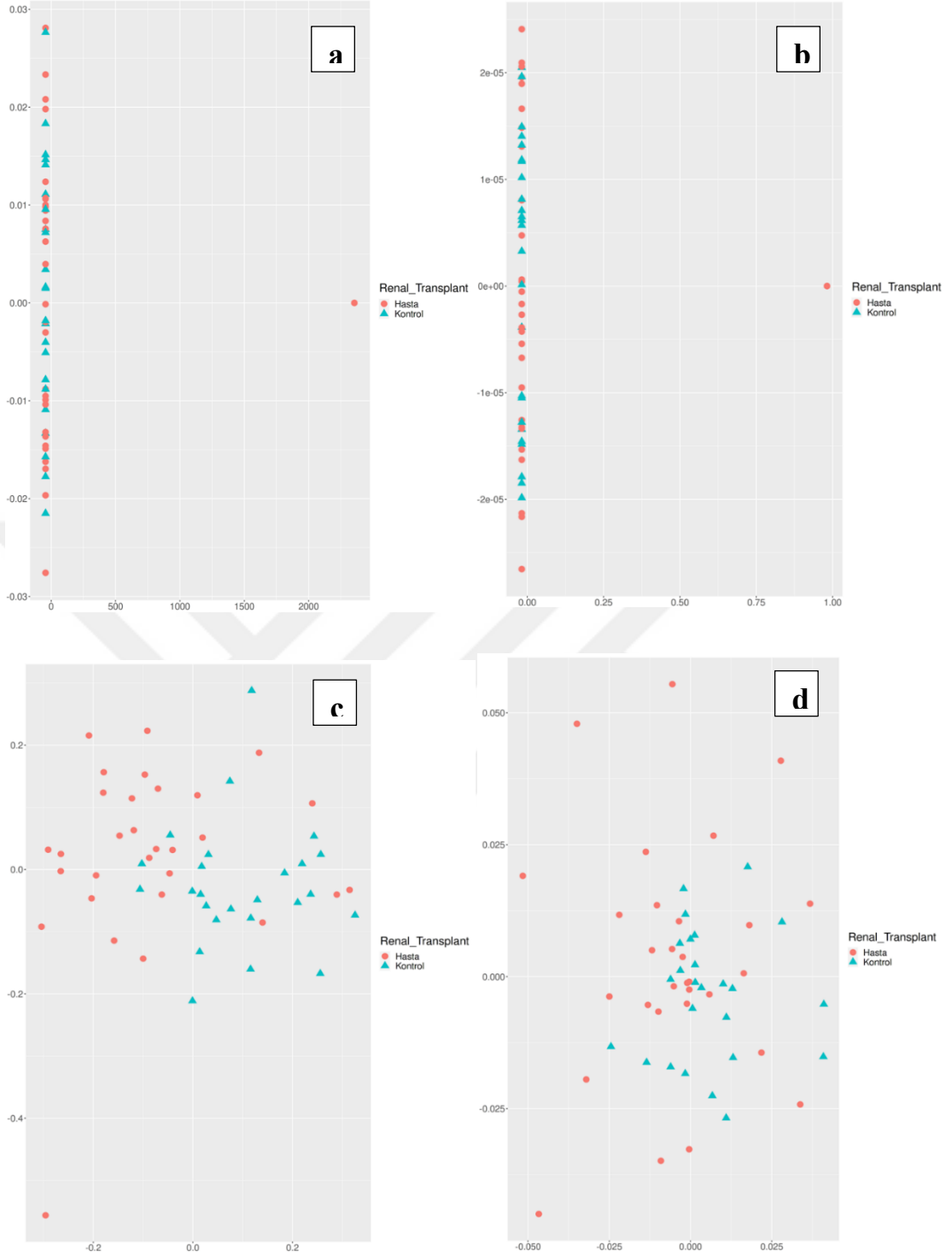
### 4.2.1. Alfa ve Beta Çeşitlilik

Her numunenin kendi içindeki bakteri çeşitliliğini yansıtan alfa çeşitlilik analizleri (Şekil 2) ve numunelerin birbirlerine göre olan çeşitliliğini yansıtan beta çeşitlilik analizlerinde (Şekil 3) hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık yoktu.



Şekil 2. Hasta ve Kontrol Grubu Karşılaştırmalı Alfa Çeşitlilik Analizleri

*a. Shannon analizi ( $p > 0,05$ ) b. Simpson analizi ( $p > 0,05$ ) c. Chao1 analizi ( $p > 0,05$ )*



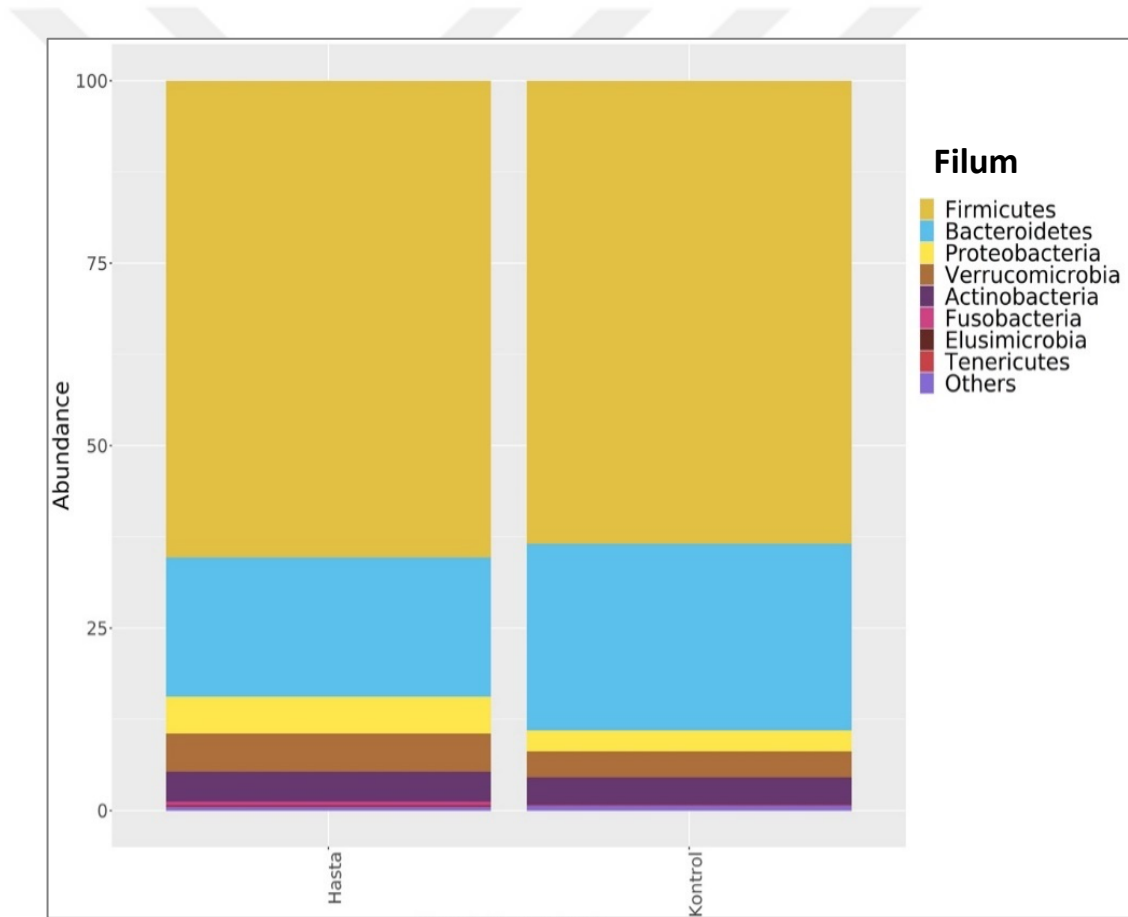
**Şekil 3. Hasta ve Kontrol Grubu Karşılaştırmalı Beta Çeşitlilik Analizleri**

**a.** Bray-Curtis analizi ( $p = 0,372$ ) **b.** Jaccard analizi ( $p = 0,309$ ) **c.** Ağırlıksız Unifrac analizi ( $p = 0,49$ ) **d.** Ağırlıklı Unifrac analizi ( $p = 0,349$ )

#### 4.2.2. Taksonomik Çeşitlilik

##### 4.2.2.1. Filum Düzeyi

Nakilli grupta filum seviyesinde Firmicutes (%62,2), Bacteroidetes (%23,6), Proteobacteria (%4,9), Actinobacteria (%3,4) ve Verrucomicrobia (%5,1) saptandı. Kontrol grubunda ise Firmicutes (%64,9), Bacteroidetes (%24,1), Verrucomicrobia (%4,5), Actinobacteria (%3,8) ve Proteobacteria (%2,2) saptandı. Hasta ve kontrol grubu filum seviyesinde karşılaştırıldığında Verrucomicrobiota'ların ( $p= 0,022$ ) ve Proteobacteria'ların ( $p= 0,034$ ) nakilli grupta anlamlı oranda yüksek bolluğu saptandı (Şekil 4).

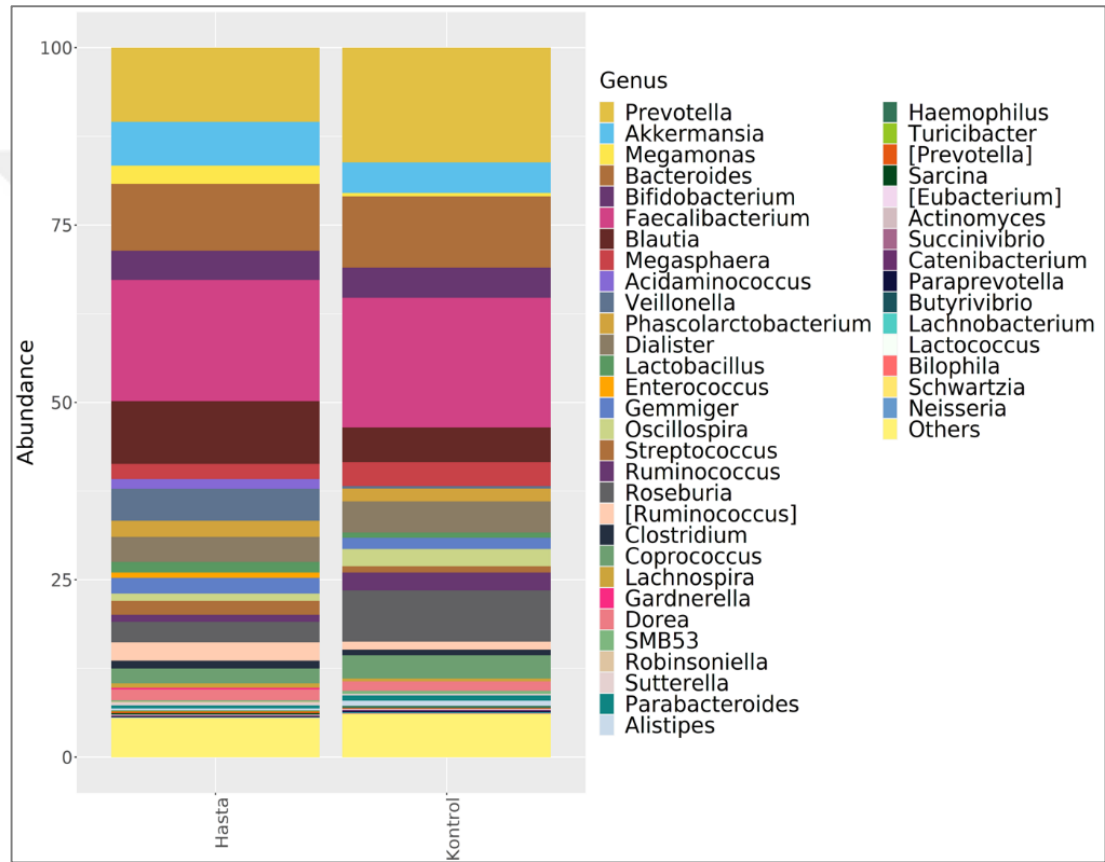


**Şekil 4. Hasta ve Kontrol Grubu Filum Seviyesinde Karşılaştırma.**

*Verrucomicrobiota'ların ( $p=0,022$ ) ve Proteobacteria'ların ( $p= 0,034$ ) nakilli grupta anlamlı oranda yüksek bolluğu taksonomik sütun grafikleri ile gösterilmektedir.*

#### 4.2.2.2. Cins Düzeyi

Nakilli grupta cins seviyesinde Faecalibacterium (%17.5), Prevotella (%14.3), Bacteroides (%10.6), Blautia (%9) ve Akkermansia (%6) saptandı. Sağlıklı kontrol grubunda ise cins düzeyinde; Faecalibacterium (%17.3), Prevotella (%15.2), Akkermansia (%5.5), Bacteroides (%9.2) ve Blautia (%5) saptandı. Cins seviyesinde hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında hasta grubunda Akkermansia ( $p= 0,022$ ) ve Neisseria ( $p= 0,034$ ) cinslerinde anlamlı oranda artış gözlemlendi (Şekil 5).

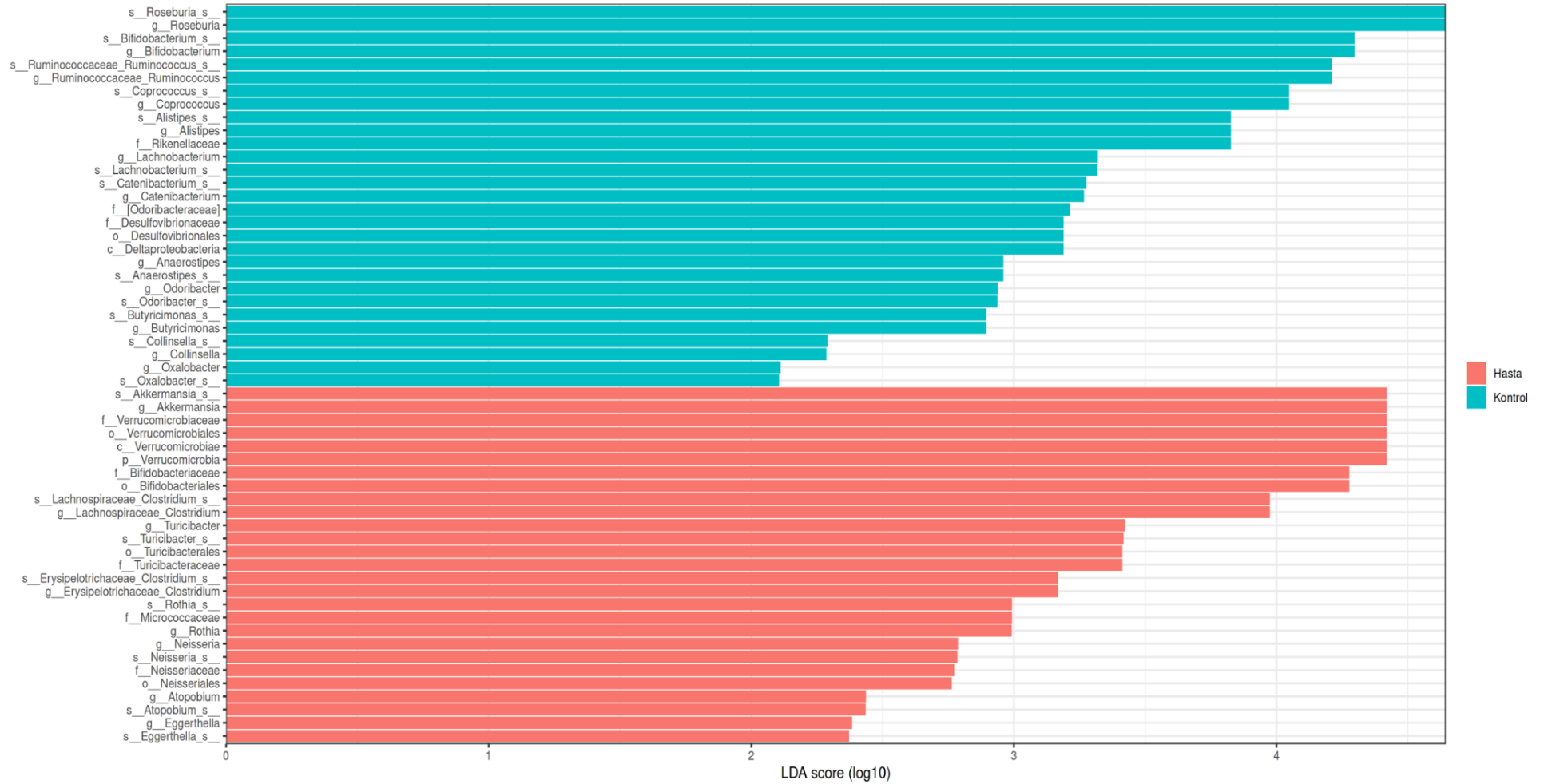


Şekil 5. Hasta ve Kontrol Grubu Cins Seviyesinde Karşılaştırılması.

*Akkermansia* ( $p= 0,022$ ) ve *Neisseria* ( $p= 0,034$ ) cinslerinin hasta grupta yüksek bolluğu taksonomik sütün grafikleri ile gösterilmektedir.

#### 4.2.2.3. LEfSe Analizi ile Taksonomik Karşılaştırma

Hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki bakteriyel kompozisyon farklılıklarını gösteren LEfSe analizi (LDA eşik değeri  $> 2$ ,  $p < 0,05$ ; eşik değerin logaritmik ifadesi ile istatistiksel anlamlı  $p$  değerlerinin kullanıldığını gösterir) verilerine göre hasta grubunda;



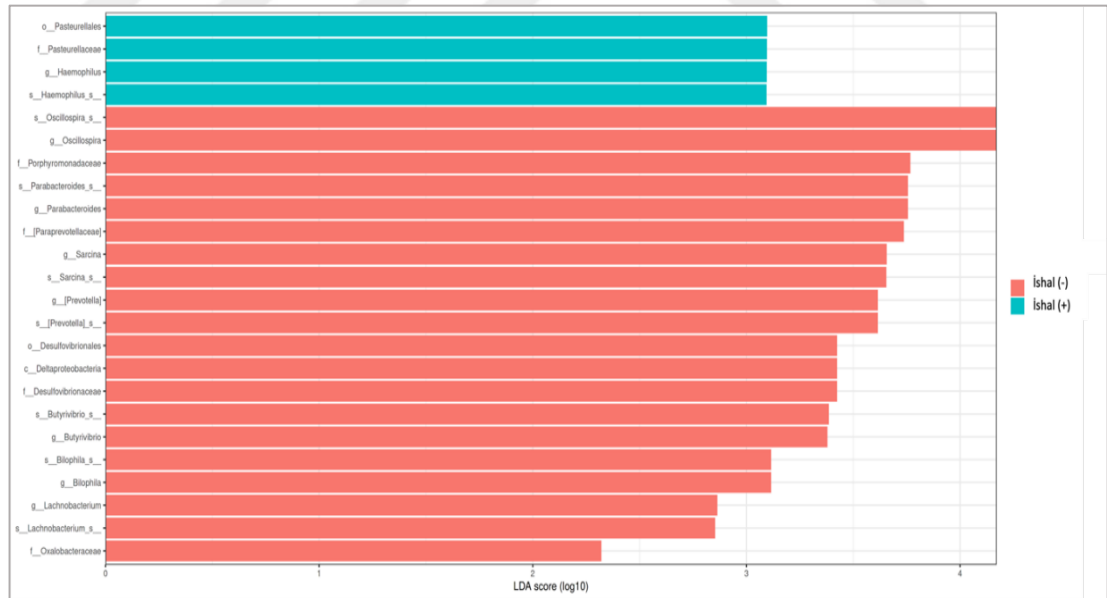
Şekil 6. Hasta ve Kontrol Grubu Taksonomik Verilerin LEFSe Analizi ile Karşılaştırılması

(LDA eşik değeri > 2,  $p < 0.05$ )

Verrucomicrobia filumu ( $p= 0,022$ ), Turicibacterecea ( $p= 0,029$ ), Micrococcacea ( $p= 0,002$ ) ve Neisseracea ( $p= 0,034$ ) ailesi artmış bollukta saptandı. Aynı karşılaştırmalı analize göre hasta grupta cins seviyesinde Akkermansia ( $p= 0,022$ ), Clostridium ( $p= 0,014$ ), Turicibacter ( $p= 0,029$ ), Rothia ( $p=0,002$ ), Neisseria ( $p=0,034$ ), Eggerthella ( $p=0,048$ ) ve Atopobium'un ( $p= 0,021$ ) anlamlı bolluğu saptandı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında cins seviyesinde; Roseburia ( $p= 0,0007$ ), Ruminococcus ( $p= 0,002$ ), Bifidobacterium ( $p= 0,037$ ), Coprococcus ( $p= 0,025$ ), Alistipes ( $p=0,001$ ), Catenibacterium ( $p= 0,022$ ), Lachnobacterium ( $p= 0,0009$ ), Odoribacter ( $p=0,001$ ), Anaerostipes ( $p=0,002$ ), Butyricimonas ( $p=0,004$ ) ve Collinsella ( $p=0,024$ ) hasta grubunda azalmış oranda bulundu (Şekil 6).

#### 4.2.2.4. LEFSe Analizi ile Hasta Grubu Klinik Özelliklerine Göre Taksonomik Karşılaştırma

Hasta grubu, disbiyozis açısından olası riskli gruplar olarak kendi içinde incelendiğinde, uzamış ishal öyküsü olan 14 hastada Pasteurellaceae ailesi ( $p= 0,01$ ) ve Haemophilus genusunun ( $p= 0,008$ ) anlamlı artışı saptandı (Şekil 7).



Şekil 7. Uzamış İshal Öyküsü Olan ve Olmayan Hasta Grubunun Karşılaştırması

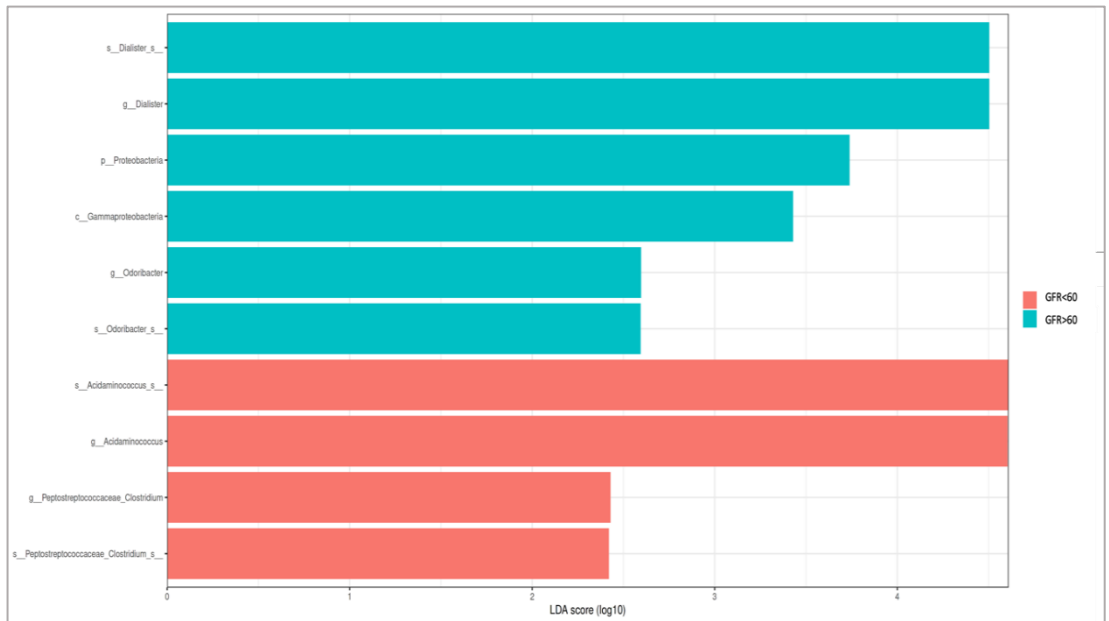
Sık tekrarlayan İYE öyküsü olan 16 hastada Firmicutes filumu ( $p= 0,008$ ), Actinobacteria filumu ( $p= 0,005$ ), Basilli sınıfı ( $p= 0,014$ ), Enterococcus cinsi ( $p=$

0,043) ve *Corynebacterium* cinsi ( $p= 0,033$ ) bakterilerin anlamlı bolluğu saptandı (Şekil 8).



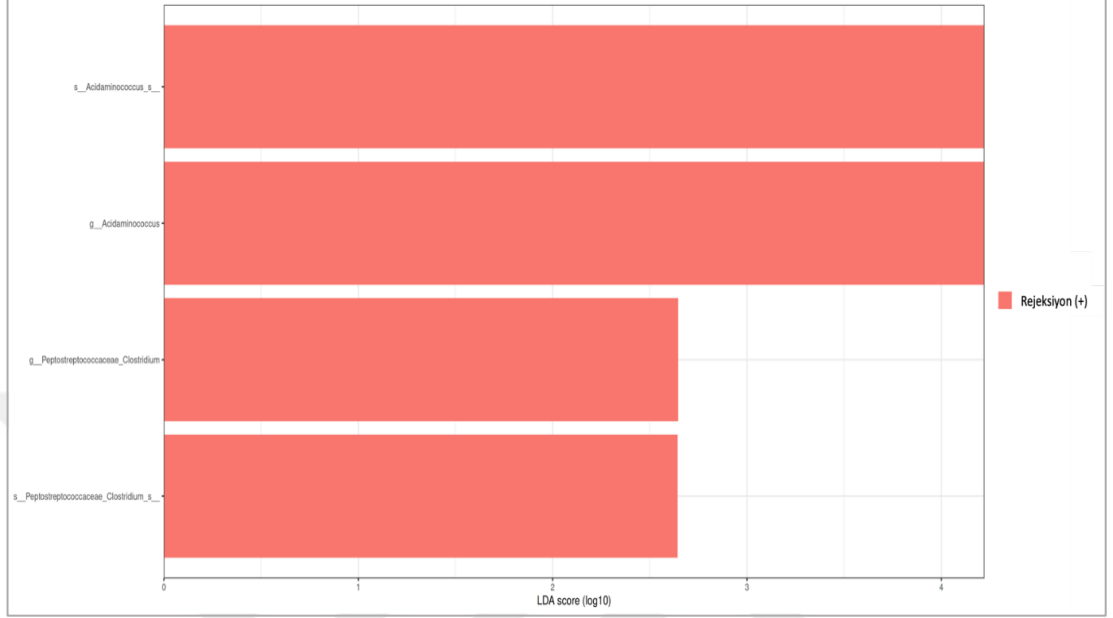
Şekil 8. İYE Öyküsü Olan ve Olmayan Hasta Grubunun Karşılaştırılması

Böbrek fonksiyon bozukluğu olup GFH  $<60$  ml/dk/1,73m<sup>2</sup> hesaplanan 12 hastada *Acidaminococcus* ( $p= 0,014$ ) ve *Clostridium* cinsi ( $p= 0,028$ ) bakteri bolluklarında anlamlı artış saptandı (Şekil 9).



Şekil 9. GFH  $<60$ ml/dk/1,73m<sup>2</sup> olan ve GFH  $>60$ ml/dk/1,73m<sup>2</sup> Hasta Grubunun Karşılaştırılması

Rejeksiyon öyküsü olan sadece 6 hasta olmasına rağmen bu hastalarda diğerlerine kıyasla *Acidaminococcus* ( $p= 0,002$ ) ve *Clostridium* ( $p= 0,036$ ) cinslerinde artış gözlemlendi (Şekil 10).



Şekil 10. Rejeksiyon Öyküsü Olan Hasta Grubu

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, böbrek nakli yapılmış çocuk hasta grubunda nakil sonrası kronik dönemde bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliği, zenginliği ve genel bileşiminin sağlıklı kontrollere göre farklılaştığını gösterdik. Bu bulgular, böbrek naklinin tek başına mikrobiyotada değişikliklere yol açabileceğini göstermektedir. Hasta ve kontrol grubu arasında alfa ve beta çeşitliliği açısından önemli farklılıklar saptanmazken, daha ayrıntılı analizler nakilli hastaların bağırsak mikrobiyota kompozisyonunda belirgin değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur.

Yapılan çalışmalar, özellikle yetişkin böbrek nakli hastalarında nakil sonrası kronik dönemde bağırsak mikrobiyotasının değiştiğini göstermiştir (1,67). Swarte ve ark. (1) çalışmasında nakilli erişkin hastalarda Proteobacteria'ların arttığı ve Actinobacteria'ların ve özellikle bütirat üreten bakterilerin bolluğunda azalma olduğu göstermişlerdir. Lee ve ark. (51) çalışmasında posttransplant popülasyonda Proteobacteria bolluğunun arttığı, özellikle ishallerde Ruminococcus, Coprococcus ve Dorea türlerinin bolluğunun azaldığı ve idrar yolu enfeksiyonu öyküsü olan transplante hastalarda Enterococcus bolluğunun arttığını ortaya koymuşlardır. Yu ve ark. (68) pretransplant ve posttransplant 1. ve 4. haftasındaki erişkin hastalar ile yapmış olduğu çalışmada pretransplant grupta Clostridia, Ruminococcus, Faecalibacterium ve Veillonellaceae bolluğunun baskın olduğunu, posttransplant grupta ise Bacilli ve Enterococcus bolluğunun baskın olduğunu göstermişlerdir. Crespo-Salgado ve ark. (69) az sayıda çocuk hasta ile yapmış olduğu çalışmada bağırsak mikrobiyota değişikliklerini hemodiyaliz, periton diyalizi ve posttransplant gruplarda karşılaştırmış ve posttransplant grupta Bifidobacteria bolluğunda anlamlı bir azalış gösterilmiştir. Sadece pediatrik hasta grubu ile yaptığımız çalışmamızda benzer şekilde posttransplant Proteobacteria bolluğunun arttığı, Ruminococcus, Coprococcus, Butyricimonas ve Bifidobacteria bolluğunun azaldığı, İYE öyküsü olan nakilli grupta Enterococcus bolluğunun arttığı gösterildi. Ancak Yu ve ark. aksine çalışmamızda en az posttransplant 1. yılında olan çocuk

hastalarda istatistiksel anlamlılık olmasa da *Faecalibacterium*, *Veillonella* ve *Clostridium* bolluklarında azalış olduğu gösterildi (**Şekil 5**).

Furusawa ve ark. (70) hayvan deneyleri ile yapmış olduğu çalışmada lifli beslenme sonucu kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) üretiminin Treg hücreleri uyarak sistemik inflamasyonu baskıladığını, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında SCFA düzeyinin ve dolayısı ile Treg hücre indüksiyonunun düşük olduğunu gösterdi. Martin ve ark. (71) yaptığı çalışmada Firmicutes filumuna ait *Faecalibacterium prausnitzii*'deki azalmanın gastrointestinal sistemdeki enflamasyonun bir belirteci olarak da kabul edilebileceği gösterildi. Bu iddiayı destekler şekilde, kistik fibrozis (72), inflamatuvar bağırsak hastalığı (73–75), hipertansiyon (76), multipl skleroz (77), obezite (78) ve tip 2 diyabet (79,80) hastalarında *F. prausnitzii* yoğunluğunda azalma bildirilmiştir. Çalışmamızda özellikle de Firmicutes filumuna ait *Lachnobacterium*, *Ruminococceae* yoğunluğunda anlamlı azalmanın yanısıra *F. prausnitzii* yoğunluğunda azalma istatistiksel anlamı düşük olsa da gösterildi. Bu durum posttransplant en az birinci yılında olan hastalarımızda devam eden bir inflamatuvar sürecin göstergesi olarak kabul edilebilir.

Erişkin hasta çalışmalarında nakil sonrası ortaya çıkan disbiyozisin, diyet kısıtlılıkları, uzun dönem kullanılan immünsüpresif ve antibiyotikler etkisiyle oluştuğu gösterilmiştir (81,82). Özellikle Proteobacteria artışının disbiyozis ile yakın ilişkili olduğu ortaya konmuştur (83). Disbiyozisin greft sağ kalımı üzerine etkisi de bildirilmiştir (67). Çalışmamızda rejeksiyon öyküsü olan ve olmayan hasta gruplarını karşılaştırdığımızda, Lee ve ark. (51) çalışmasında nakilli erişkin hastalarda gösterdiğine benzer şekilde, rejeksiyon öyküsü olan grupta filum düzeyinde Firmicutes yoğunluğunda azalma, Actinobacteria ve Proteobacteria, Bacteroidetes yoğunluğunda ise artış gösterdik (**Şekil 10**).

Gomez ve ark. (84) obezite ile intestinal mikrobiyota ilişkisini inceledikleri çalışmada obezitenin mevcut olduğu kişilerde filum seviyesinde Firmicutes, cins seviyesinde *Clostridium* ve tür seviyesinde *Eubacterium rectale*, *Clostridium coccoides*, *Lactobacillus reuteri*, *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium histolyticum* ve *Staphylococcus aureus* bolluğunda artış gösterildi. Çalışmamızda hasta grupta

sadece 2 obez çocuk mevcut olsa da tür seviyesinde Akkermansia muciniphila artmış bolluğu hastalardaki kötü beslenme geçmişi hakkında bilgi verebilir.

### **5.1. Çalışmamızın Güçlü ve Kısıtlı Yanları**

Çalışmamızın en güçlü yanı, son yıllarda klinikteki bilgilerimizi pek çok açıdan güncelleyen bağırsak mikrobiyotasını böbrek nakilli çocukda inceleyen geniş kohorta sahip bir çalışma olmasıdır. Bunun yanı sıra ise tek merkezli, kesitsel vaka-kontrol çalışması olması ve en az 1 yıldır nakilli olan hastaların mikrobiyota kompozisyonlarının hemen nakil sonrası döneme kıyasla daha stabil bir dönemi yansıtır olması çalışmamızda sayılabilecek diğer güçlü yönlerdendir.

Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı bütçe yetersizliği sebebiyle yalnızca 55 örnek için 16S rRNA metagenom analizinin karşılanabilmiş olmasıdır. Yine aynı sebeple örneklem boyutu nakil öncesi ve nakil sonrası akut/kronik dönem olarak genişletilememiştir. Bir diğer kısıtlılık hasta ve kontrol grubundaki tüm çocuklarda homojenliği tam olarak sağlamak, bağırsak mikrobiyotasını etkileyen doğum şekli, anne sütü kullanımı, etnik ve kültürel geçmiş, beslenme farklılıkları gibi çeşitli faktörler dolayısıyla mümkün olmamıştır. Ancak hasta ve kontrol grubu yaş, cinsiyet ve VKİ özellikleri açısından benzer seçilerek bu negatif yönler ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır.

## 6. SONUÇLAR

Böbrek nakilli pediatrik hasta grubunda intestinal mikrobiyota değişmekte, disbiyozis gözlenmektedir. Çalışmamıza göre hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında alfa ve beta çeşitlilik açısından anlamlı bir farklılık yoktu ancak nakilli grupta bağırsakta hâkim olan 4 ana filumun yanısıra Verrucomicrobia filumunda artış gösterildi. Yararlı bakteriler arasında sayılan Butyricimonas genusunun azalıp, zararlı bakterilerden Neisseriaların arttığı gösterildi. İntestinal mikrobiyota meydana gelen bu değişimin klinik izlemde ortaya çıkan rejeksiyon, uzamış ishaller, sık idrar yolu enfeksiyonları ve üremik ortam ile ilişkisi gösterildi. Disbiyozis için olası risk faktörleri ortaya koyuldu. Hastaların enfeksiyon dönemindeki bağırsak mikrobiyotaları da dahil edilerek daha doğru çıkarımlar yapılabilir.

Çalışmaya dahil edilen böbrek nakilli çocuklar için son 6 ay içerisinde enfeksiyon bulgusu olmamasına rağmen saptanan disbiyozisin sebeplerinden birinin de nakil sonrası yoğun immünsüpresif tedaviler ve antibiyotikler olduğu düşünüldü. Çalışmaya nakil sonrası akut ve kronik dönemdeki hastaların bağırsak mikrobiyota karşılaştırması eklenerek daha kapsamlı değerlendirmeler sunulabilir.

Çocuklarda mikrobiyota kompozisyonunda tespit edilen değişikliklerin, yetişkinlikte olduğu gibi bu dönemde de çocuğun bağışıklık sistemini, gastrointestinal sistemini, metabolizmasını ve beyin-bağırsak eksenini etkilerinin önemli olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz tüm bu değişikliklerin bir neden mi yoksa sonuç mu olduğunu belirlemek ve prognoz üzerindeki etkilerini uzun vadeli gözlemlemek için daha geniş serilerde çalışmalar yapılması gerekmektedir. Günümüzde, yaygın olarak kullanılan prebiyotiklerin, probiyotiklerin ve hatta fekal mikrobiyota nakillerinin hedefe yönelik ve prognostik değerini belirlemek için daha geniş ve daha kesin verilere ihtiyaç olduğu açıktır.

## 7. KAYNAKÇA

1. Swarte JC, Douwes RM, Hu S, Vich Vila A, Eisenga MF, van Londen M, et al. Characteristics and Dysbiosis of the Gut Microbiome in Renal Transplant Recipients. *J Clin Med*. 2020 Feb 1;9(2):386.
2. Gevers D, Knight R, Petrosino JF, Huang K, McGuire AL, Birren BW, et al. The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome. *PLoS Biol*. 2012 Aug 14;10(8):e1001377.
3. Stavropoulou E, Kantartzi K, Tsigalou C, Konstantinidis T, Romanidou G, Voidarou C, et al. Focus on the Gut–Kidney Axis in Health and Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jan 21;7.
4. Evenepoel P, Poesen R, Meijers B. The gut–kidney axis. *Pediatric Nephrology*. 2017 Nov 15;32(11):2005–14.
5. Yang CY, Tarng DC. Diet, gut microbiome and indoxyl sulphate in chronic kidney disease patients. *Nephrology*. 2018 Oct; 23:16–20.
6. Toral M, Robles-Vera I, de la Visitación N, Romero M, Yang T, Sánchez M, et al. Critical Role of the Interaction Gut Microbiota – Sympathetic Nervous System in the Regulation of Blood Pressure. *Front Physiol*. 2019 Mar 8;10.
7. Vaziri ND, Yuan J, Nazertehrani S, Ni Z, Liu S. Chronic Kidney Disease Causes Disruption of Gastric and Small Intestinal Epithelial Tight Junction. *Am J Nephrol*. 2013;38(2):99–103.
8. Wang IK, Lai HC, Yu CJ, Liang CC, Chang CT, Kuo HL, et al. Real-Time PCR Analysis of the Intestinal Microbiotas in Peritoneal Dialysis Patients. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Feb 15;78(4):1107–12.
9. Fricke WF, Maddox C, Song Y, Bromberg JS. Human Microbiota Characterization in the Course of Renal Transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2014 Feb;14(2):416–27.
10. Winichakoon P, Chaiwarith R, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Impact of gut microbiota on kidney transplantation. *Transplant Rev*. 2022 Jan;36(1):100668.
11. Lee JR, Magruder M, Zhang L, Westblade LF, Satlin MJ, Robertson A, et al. Gut microbiota dysbiosis and diarrhea in kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2019 Feb;19(2):488–500.
12. Schwartz GJ, Mun [Combining Tilde] oz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA, et al. New Equations to Estimate GFR in Children with CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009 Mar;20(3):629–37.
13. Inker LA, Astor BC, Fox CH, Isakova T, Lash JP, Peralta CA, et al. KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of CKD. *American Journal of Kidney Diseases*. 2014 May;63(5):713–35.

14. Warady BA, Chadha V. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatric Nephrology*. 2007 Dec 20;22(12):1999–2009.
15. Deleau J, Andre JL, Briancon S, Musse JP. Chronic renal failure in children: an epidemiological survey in Lorraine (France) 1975?1990. *Pediatric Nephrology*. 1994 Aug;8(4):472–6.
16. Ardissino G, Daccò V, Testa S, Bonaudo R, Claris-Appiani A, Taioli E, et al. Epidemiology of Chronic Renal Failure in Children: Data From the ItalKid Project. *Pediatrics*. 2003 Apr 1;111(4):e382–7.
17. Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatric Nephrology*. 2012 Mar 29;27(3):363–73.
18. Madani K, Otoukesh H, Rastegar A, Van Why S. Chronic renal failure in Iranian children. *Pediatric Nephrology*. 2001 Jan 31;16(2):140–4.
19. Hamed RMA. The spectrum of chronic renal failure among Jordanian children. *J Nephrol*. 2002;15(2):130–5.
20. Al-Eisa A, Naseef M, Al-Hamad N, Pinto R, Al-Shimeri N, Tahmaz M. Chronic renal failure in Kuwaiti children: an eight-year experience. *Pediatric Nephrology*. 2005 Dec 16;20(12):1781–5.
21. Esbjörner E, Berg U, Hansson S. Epidemiology of chronic renal failure in children: a report from Sweden 1986-1994. *Pediatric Nephrology*. 1997 Jul 28;11(4):438–42.
22. Bek K, Akman S, Bilge I, Topaloğlu R, Çalışkan S, Peru H, et al. Chronic kidney disease in children in Turkey. *Pediatric Nephrology*. 2009 Apr 1;24(4):797–806.
23. Soylemezoğlu O, Duzova A, Yalcinkaya F, Arinsoy T, Suleymanlar G. Chronic renal disease in children aged 5-18 years: a population-based survey in Turkey, the CREDIT-C study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012 Oct 1;27(suppl 3):iii146–51.
24. Eddy AA. Progression in Chronic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2005 Oct;12(4):353–65.
25. Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T, Hallan S, Iversen BM. Low Birth Weight Increases Risk for End-Stage Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008 Jan;19(1):151–7.
26. González Celedón C, Bitsori M, Tullus K. Progression of chronic renal failure in children with dysplastic kidneys. *Pediatric Nephrology*. 2007 Jul 1;22(7):1014–20.
27. Ding W. Impact of obesity on kidney function and blood pressure in children. *World J Nephrol*. 2015;4(2):223.
28. A Griffin K, Pothugunta K, Polichnowski AJ, Bidani AK. The Role of Systemic Blood Pressure in the Progression of Chronic Kidney Disease. *Curr Cardiovasc Risk Rep*. 2015 May 25;9(5):23.
29. Furth SL, Pierce C, Hui WF, White CA, Wong CS, Schaefer F, et al. Estimating Time to ESRD in Children With CKD. *American Journal of Kidney Diseases*. 2018 Jun;71(6):783–92.
30. Hogg RJ, Furth S, Lemley K V., Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, et al. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease in Children and Adolescents: Evaluation, Classification, and Stratification. *Pediatrics*. 2003 Jun 1;111(6):1416–21.

31. van de Luijngaarden MWM, Noordzij M, Tomson C, Couchoud C, Cancarini G, Ansell D, et al. Factors Influencing the Decision to Start Renal Replacement Therapy: Results of a Survey Among European Nephrologists. *American Journal of Kidney Diseases*. 2012 Dec;60(6):940–8.
32. Favel K, Dionne JM. Factors influencing the timing of initiation of renal replacement therapy and choice of modality in children with end-stage kidney disease. *Pediatric Nephrology*. 2020 Jan 25;35(1):145–51.
33. Etesami K, Lestz R, Hogen R. Pediatric kidney transplantation in the United States. *Curr Opin Organ Transplant*. 2020 Aug;25(4):343–7.
34. Kelly DA. Current issues in pediatric transplantation. *Pediatr Transplant*. 2006 Sep 19;10(6):712–20.
35. Flint HJ. The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012 Aug;70:S10–3.
36. Ferranti EP, Dunbar SB, Dunlop AL, Corwin EJ. 20 Things You Didn't Know About the Human Gut Microbiome. *Journal of Cardiovascular Nursing*. 2014 Nov;29(6):479–81.
37. Al Bander Z, Nitert MD, Mousa A, Naderpoor N. The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Oct 19;17(20):7618.
38. Belizário JE, Faintuch J. Microbiome and Gut Dysbiosis. In 2018. p. 459–76.
39. Iebba V, Totino V, Gagliardi A, Santangelo F, Cacciotti F, Trancassini M, et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol*. 2016 Jan;39(1):1–12.
40. Eloe-Fadrosh EA, Rasko DA. The Human Microbiome: From Symbiosis to Pathogenesis. *Annu Rev Med*. 2013 Jan 14;64(1):145–63.
41. Ogunrinola GA, Oyewale JO, Oshamika OO, Olasehinde GI. The Human Microbiome and Its Impacts on Health. *Int J Microbiol*. 2020 Jun 12;2020:1–7.
42. Yang I, Corwin EJ, Brennan PA, Jordan S, Murphy JR, Dunlop A. The Infant Microbiome. *Nurs Res*. 2016 Jan;65(1):76–88.
43. Yao Y, Cai X, Ye Y, Wang F, Chen F, Zheng C. The Role of Microbiota in Infant Health: From Early Life to Adulthood. *Front Immunol*. 2021;12:708472.
44. Hoang DM, Levy EI, Vandenplas Y. The impact of Caesarean section on the infant gut microbiome. *Acta Paediatr*. 2021 Jan;110(1):60–7.
45. Hoen AG, Coker MO, Madan JC, Pathmasiri W, McRitchie S, Dade EF, et al. Association of Cesarean Delivery and Formula Supplementation with the Stool Metabolome of 6-Week-Old Infants. *Metabolites*. 2021 Oct 13;11(10).
46. Hasan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*. 2019;7:e7502.
47. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009 Jun 9;9:123.
48. Ohkusa T, Koido S, Nishikawa Y, Sato N. Gut Microbiota and Chronic Constipation: A Review and Update. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:19.
49. Vanholder R, Glorieux G. The intestine and the kidneys: a bad marriage can be hazardous. *Clin Kidney J*. 2015 Apr 1;8(2):168–79.

50. Holle J, Bartolomaeus H, Löber U, Behrens F, Bartolomaeus TUP, Anandakumar H, et al. Inflammation in Children with CKD Linked to Gut Dysbiosis and Metabolite Imbalance. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2022 Dec;33(12):2259–75.
51. Lee JR, Muthukumar T, Dadhanian D, Toussaint NC, Ling L, Pamer E, et al. Gut Microbial Community Structure and Complications After Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2014 Oct 15;98(7):697–705.
52. Chong PP, Koh AY. The gut microbiota in transplant patients. *Blood Rev*. 2020 Jan;39:100614.
53. Neyzi O, Günöz H, Furman A, Bundak R, Gökçay G, Darendeliler F, et al. Türk çocuklarında vücut ağırlığı, boy uzunluğu, baş çevresi ve vücut kitle indeksi referans değerleri. Vol. 51, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2008.
54. Moudgil A, Jordan SC. Renal transplantation in infants and children. *The Indian Journal of Pediatrics*. 1999 Mar;66(2):263–75.
55. Simões e Silva AC, Oliveira EA, Mak RH. Urinary tract infection in pediatrics: an overview. *J Pediatr (Rio J)*. 2020 Mar;96:65–79.
56. Shankar S, Rosenbaum J. Chronic diarrhoea in children: A practical algorithm-based approach. *J Paediatr Child Health*. 2020 Jul 28;56(7):1029–38.
57. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019 Aug 24;37(8):852–7.
58. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016 Jul;13(7):581–3.
59. Schloss PD. Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters. *mSphere*. 2021 Aug 25;6(4).
60. Werner JJ, Koren O, Hugenholtz P, DeSantis TZ, Walters WA, Caporaso JG, et al. Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16s rRNA gene surveys. *ISME J*. 2012 Jan;6(1):94–103.
61. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One*. 2013 Apr 22;8(4):e61217.
62. Kruskal WH, Wallis ; W Allen. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. Vol. 47, *Journal of the American Statistical Association*. 1952.
63. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Dec;71(12):8228–35.
64. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014 Dec 5;15(12):550.
65. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Mar;73(5):1576–85.
66. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011;12(6):R60.

67. Ardalan M, Vahed SZ. Gut microbiota and renal transplant outcome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Jun;90:229–36.
68. Yu DH, Ying N, Lian ZH, Fa YQ. The Alteration human of gut microbiota and metabolites before and after renal transplantation. *Microb Pathog*. 2021 Nov;160:105191.
69. Crespo-Salgado J, Vehaskari VM, Stewart T, Ferris M, Zhang Q, Wang G, et al. Intestinal microbiota in pediatric patients with end stage renal disease: a Midwest Pediatric Nephrology Consortium study. *Microbiome*. 2016 Dec 17;4(1):50.
70. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):446–50.
71. Martín R, Miquel S, Benevides L, Bridonneau C, Robert V, Hudault S, et al. Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic. *Front Microbiol*. 2017 Jun 30;8.
72. Bruzzese E, Callegari ML, Raia V, Viscovo S, Scotto R, Ferrari S, et al. Disrupted Intestinal Microbiota and Intestinal Inflammation in Children with Cystic Fibrosis and Its Restoration with *Lactobacillus GG*: A Randomised Clinical Trial. *PLoS One*. 2014 Feb 19;9(2):e87796.
73. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Oct 28;105(43):16731–6.
74. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014 Aug;63(8):1275–83.
75. Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Apr 19;17(4):223–37.
76. Mushtaq N, Hussain S, Zhang S, Yuan L, Li H, Ullah S, et al. Molecular characterization of alterations in the intestinal microbiota of patients with grade 3 hypertension. *Int J Mol Med*. 2019 Jun 6;
77. Clemente JC, Manasson J, Scher JU. The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ*. 2018 Jan 8;j5145.
78. Maioli TU, Borrás-Nogues E, Torres L, Barbosa SC, Martins VD, Langella P, et al. Possible Benefits of *Faecalibacterium prausnitzii* for Obesity-Associated Gut Disorders. *Front Pharmacol*. 2021 Dec 2;12.
79. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouilliot JL, et al. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery–Induced Weight Loss. *Diabetes*. 2010 Dec 1;59(12):3049–57.
80. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*. 2013;8(8):e71108.

81. Fricke WF, Bromberg JS. Checks and Balances—Microbiota Shifts in Immunosuppressed Mice. Transplantation. 2017 Jan;101(1):26–7.
82. Tourret J, Willing BP, Dion S, MacPherson J, Denamur E, Finlay BB. Immunosuppressive Treatment Alters Secretion of Ileal Antimicrobial Peptides and Gut Microbiota, and Favors Subsequent Colonization by Uropathogenic *Escherichia coli*. Transplantation. 2017 Jan;101(1):74–82.
83. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends Biotechnol. 2015 Sep;33(9):496–503.
84. Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. Gut Microbes. 2018 Jul 4;9(4):308–25.

